



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO  
DIPARTIMENTO DEMETRA FACOLTÀ' DI AGRARIA

Dottorato di Ricerca in: Gestione Fitosanitaria Ecocompatibile in Ambienti Agro-forestali e Urbani

## **Monitoraggio dei marciumi radicali da *Phytophthora* nei vivai di piante ornamentali in Italia**

Settore scientifico disciplinare AGR12

TESI DI

**Dott. Francesco Badalà**

COORDINATORE DEL DOTTORATO

**Prof. Stefano Colazza**

TUTOR

**Prof.ssa Antonella Pane**

CO-TUTOR

**Prof. Gaetano Magnano di San Lio**

CICLO XXIII – ANNO ACCADEMICO 2012–2013.

---

DOTTORATO



## INDICE

	Pag.
1. INTRODUZIONE	1
1.1. Lo scenario florovivaistico internazionale	1
1.2. Il florovivaismo in Sicilia	7
1.3. Problemi fitopatologici emergenti nelle colture ornamentali	10
1.4. I marciumi radicali da <i>Phytophthora</i> delle piante ornamentali	11
1.5. Importanza e diffusione di <i>Phytophthora</i>	12
1.6. Caratteristiche del genere <i>Phytophthora</i>	16
1.7. Ciclo biologico delle specie di <i>Phytophthora</i>	19
1.8. Effetti delle infezioni di <i>Phytophthora</i> sull'apparato radicale	23
1.9. Strategie di difesa integrata nei confronti di <i>Phytophthora</i>	25
1.10. Metodi di isolamento e monitoraggio	33
1.11. Valori critici della densità d'inoculo e criteri di campionamento	36
1.12. I metodi di diagnosi molecolare	37
2. SCOPO DELLA RICERCA	41
3. MATERIALI E METODI	42
3.1. Prelievo di campioni e monitoraggio	42
3.2. Substrati utilizzati per l'ottenimento degli isolati di <i>Phytophthora</i>	43
3.3. Isolamento ed identificazione delle specie di <i>Phytophthora</i> agenti di marciumi radicali di piante	44
3.3.1. Isolamento di <i>Phytophthora</i> dal terreno	44
3.3.2. Isolamento dalle radici	45
3.3.3. Isolamento da tessuti del fusto	46
3.4. Determinazione delle caratteristiche morfologiche e colturali degli isolati	46
3.4.1. Tecnica per la produzione degli sporangi	46
3.5. Caratterizzazione molecolare	48
3.5.1. Estrazione del DNA	48

3.5.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)	48
3.5.3. Sequenziamento e analisi della regione ITS	49
3.6. Valutazione della patogenicità degli isolati di <i>Phytophthora</i>	50
3.6.1. Saggi di patogenicità su <i>Polygala myrtifolia</i> – 1 <sup>a</sup> prova	50
3.6.2. Saggi di patogenicità su <i>Polygala myrtifolia</i> – 2 <sup>a</sup> prova	52
3.6.3. Saggi di patogenicità su <i>Trachycarpus fortunei</i>	53
3.7. Impiego di un ammendante con attività biologica nei confronti di <i>Phytophthora multivora</i> e <i>Cylindrocladium pauciramosum</i>	53
3.8. Confronto dell'efficacia di due ammendanti con attività biologica nei confronti di <i>Phytophthora multivora</i> e <i>Cylindrocladium pauciramosum</i>	55
4. RISULTATI	56
4.1. Monitoraggio nei vivai di piante ornamentali	56
4.2. Saggi di patogenicità su <i>Polygala myrtifolia</i> – 1 <sup>a</sup> prova	76
4.3. Saggi di patogenicità su <i>Polygala myrtifolia</i> – 2 <sup>a</sup> prova	78
4.4. Saggi di patogenicità su <i>Trachycarpus fortunei</i>	79
4.5. Impiego di un ammendante con attività biologica nei confronti di <i>Phytophthora multivora</i> e <i>Cylindrocladium pauciramosum</i>	80
4.6. Confronto dell'efficacia di due ammendanti con attività biologica nei confronti di <i>Phytophthora multivora</i> e <i>Cylindrocladium pauciramosum</i>	81
5. DISCUSSIONE	84
6. BIBLIOGRAFIA	88



## **1. INTRODUZIONE**

### **1.1. Lo scenario florovivaistico internazionale**

Il florovivaismo è un comparto dinamico che coinvolge più di cinquanta paesi in tutto il mondo e che ha visto crescere in maniera considerevole negli ultimi anni il livello di competitività internazionale; inoltre, come altri comparti dell'economia, è stato influenzato dai numerosi eventi che hanno caratterizzato il mondo politico e commerciale mondiale fino alla recente crisi finanziaria e all'aumento dei costi delle materie prime e dei prodotti energetici. Il contesto creatosi richiede, in particolare nel nostro paese ed in Europa, ingenti investimenti per incrementare la produttività, ampliare l'assortimento ed offrire un prodotto di alta qualità a prezzi contenuti in modo da restare competitivi nella crescente competizione internazionale. Secondo le statistiche ufficiali riferite al 2009 nel mondo sono destinati alle produzioni florovivaistiche 1,3 milioni di ettari suddivisi tra fiori e piante in vaso (530.000 ettari), piante da vivaio (oltre 700.000 ettari) e bulbi (70.000 ettari). Il valore complessivo della produzione florovivaistica raggiunge quasi 77 miliardi di euro.

I tre quinti della superficie florovivaistica mondiale è localizzata in Asia (circa 800.000 ettari) principalmente in India, che vanta un'antica tradizione di produzione di fiori recisi destinati soprattutto al mercato interno, e in Cina, che, dopo l'entrata nell'Organizzazione Mondiale del Commercio (OMC), sta usufruendo dei vantaggi derivanti dalla riduzione dei prezzi dei prodotti agricoli e dalla maggiore libertà commerciale.

Per quanto riguarda la produzione di fiori recisi vanno segnalati alcuni paesi del Centro-Sud America (Colombia, Ecuador) e dell'Africa (Kenya,

Etiopia, Ruanda, Uganda) dove, a partire dagli inizi degli anni settanta le favorevoli condizioni dal punto di vista pedo-climatico, i bassi costi della manodopera nonché le politiche di sostegno adottate a livello internazionale e dai governi locali, hanno permesso di collocare le proprie produzioni sui mercati dei paesi consumatori (Nord America, Giappone, Germania, Regno Unito e paesi del Nord Europa). Tra i paesi africani quello che ha registrato il più elevato tasso di crescita della produzione negli ultimi anni è il Kenya, caratterizzato da aziende, spesso di proprietà europea, di grandi dimensioni, mentre l'Etiopia sta emergendo sul mercato internazionale grazie alle politiche di incentivazione alla produzione messa in atto dal governo locale che consiste nel detassare le nuove aziende e nel favorire l'importazione di macchinari e infrastrutture. Se i paesi africani provvedono soprattutto a rifornire il mercato europeo, l'America Latina rifornisce di fiori il continente nordamericano. Il successo di Ecuador e Colombia è da ricercare oltre che nelle favorevoli condizioni climatiche e nei bassi costi della manodopera, anche nella scelta politica di favorire le aziende volte all'esportazione, nonché nella presenza di aziende di grosse dimensioni, spesso di proprietà statunitense, volte alla ricerca di tecniche innovative atte ad ottimizzare la produzione.

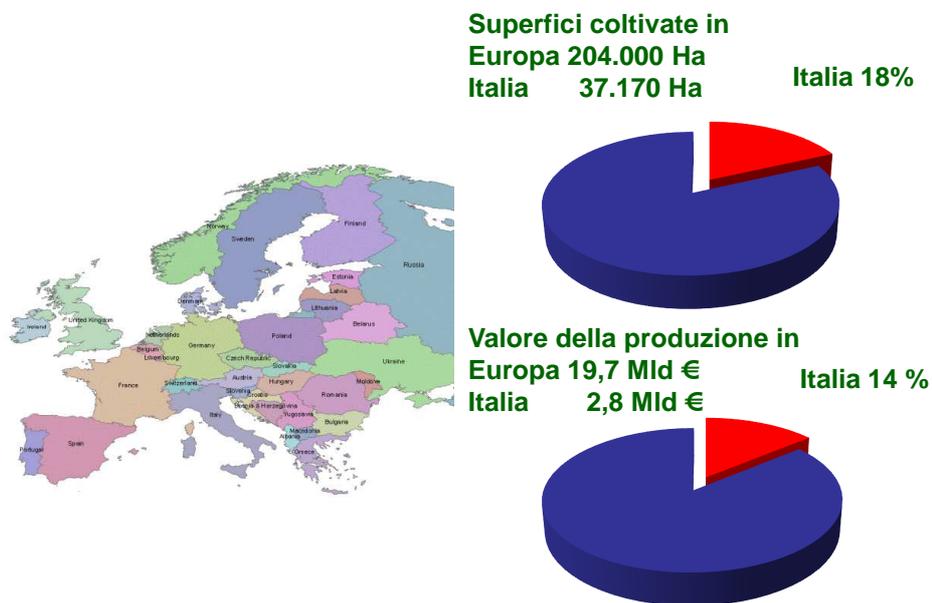
La crisi finanziaria mondiale e l'aumento dei costi delle materie prime ha colpito anche i paesi del Centro-Sud America e dell'Africa, per esempio Kenya ed Etiopia nel mese di febbraio 2009 si sono trovate costrette a distruggere una parte della produzione in quanto i costi di trasporto, aggiunti a quelli di produzione, non sarebbero stati ripagati dal miglior prezzo spuntabile sul mercato olandese, loro principale sbocco commerciale.

In Europa e negli Stati Uniti la produzione di fiori e piante riveste una

notevole importanza economica e sociale; coinvolge circa il 31% della superficie mondiale destinata a fiori e piante ornamentali e il 62% della produzione mondiale florovivaistica. Negli ultimi 10 anni però si sta registrando un trend negativo sia di superfici investite sia del valore del prodotto nell'area dell'Unione Europea. Nel 2009 si è avuta una diminuzione di superficie dell'1,1% rispetto all'anno precedente ad eccezione della sola Olanda dove la superficie è aumentata dello 0,5% e le aziende sono diminuite segno evidente di un processo di ristrutturazione in corso.

Le ragioni di ciò affondano le radici in diverse motivazioni: gli alti costi energetici (nell'Unione Europea si ha la più alta intensità di produzione per ettaro utilizzando la tecnica di coltivazione in serra), l'aumento della pressione competitiva (costi di produzione relativi a lavoro, tassazione e condizioni ambientali) e la stagnazione della domanda, che comporta la riduzione dei prezzi sul mercato internazionale, conseguenza anche dell'alto valore dell'euro, che si ripercuote negativamente sulle esportazioni verso gli Stati Uniti e i paesi limitrofi.

Il sistema commerciale europeo di fiori e piante ornamentali ruota intorno all'Olanda, che svolge una funzione centrale negli scambi sia extracomunitari, sia intra-comunitari. Il successo ottenuto dagli olandesi è da ricercare sia nella capacità dimostrata sul piano produttivo che su quello commerciale: la vendita all'asta ha permesso all'Olanda di porsi come centro della contrattazione commerciale del proprio e altrui prodotto. Nel mondo il valore della produzione imputabile al settore florovivaistico nel 2009 è pari a 77 miliardi di euro, l'Europa con 19,7 miliardi di euro copre il 25,5% della produzione mondiale (Eurostat/Ministero). Il florovivaismo in Europa nel 2010 contribuiva in valore al 5,8% della



**Fig. 1.** Il peso del florovivaismo italiano in Europa

produzione agricola dell'UE a 27 (Eurostat 2010). L'Italia è seconda in termini di valore della produzione florovivaistica solo all'Olanda: la produzione ai prezzi correnti nel 2009 è di 2,77 miliardi di euro pari al 6,2% dell'intera produzione agricola nazionale e al 14% della produzione florovivaistica europea (Ismea/Istat 2009).

Il comparto florovivaistico italiano risulta caratterizzato da un numero elevato di aziende soprattutto di piccole dimensioni (l'estensione media è infatti pari a 1.200 mq) in cui l'attività di coltivazione è principalmente labour intensive: le aziende produttrici sono 31.170 e la superficie interessata è pari a 37.132 ettari (Istat 2010). La produzione risulta diversificata con delle specializzazioni prevalenti a seconda dell'area geografica: in Liguria sono localizzate le produzioni di aromatiche, in Toscana i vivai di alberi ed arbusti, sul Lago Maggiore le piante acidofile, in Campania i fiori recisi e in Sicilia gli agrumi ornamentali. La vocazione

territoriale e la tradizionale specializzazione nella coltivazione di fiori e piante che caratterizza alcune aree dell'Italia hanno favorito la costituzione di specifici distretti agricoli florovivaistici. Tra quelli specializzati nelle produzioni floricole si ricordano il Distretto Agricolo Florovivaistico del Ponente Ligure la cui produzione principale riguarda la produzione floricola locale di fiori e fronde recise, piante in vaso e materiale vivaistico da ricoltivare (per fiore reciso o vaso), il Distretto Floricolo del Lago Maggiore che ha lo scopo di incentivare la produzione floricola di piante arbustive acidofile, il Distretto Florovivaistico interprovinciale di Lucca e Pistoia che si occupa della produzione di fiori e fronde recisi e piante da fiore in vaso (azalee, ortensie, stelle di natale), il Distretto Floricolo Siciliano le cui principali produzioni riguardano le piante in vaso e gli agrumi ornamentali. Tra i distretti vivaistici si segnala quello di Pistoia che si propone di favorire lo sviluppo economico e la valorizzazione del settore vivaistico e il Distretto Vivaistico di Canneto sull'Oglio considerato il principale produttore a livello europeo di piante caducifoglie.

Il settore vivaistico è cresciuto sempre sino al 2008 sia in termini di superficie che di valore, negli ultimi anni invece c'è stata un'inversione di tendenza con una diminuzione del valore della produzione del 9% tra il 2008 e il 2009, mentre il settore del fiore reciso sta registrando una contrazione da molti anni. Le maggiori difficoltà riscontrate dalle aziende floricole italiane rispetto a quelle di altre realtà, come per esempio quelle olandesi, sono da ricercare in diversi fattori: alla polverizzazione aziendale che riduce la capacità di investimento tecnologico e alla frammentazione che provoca la dispersione dell'offerta vanno aggiunti gli elevati costi di produzione e l'inadeguatezza delle strutture commerciali nazionali nonché la concorrenza internazionale.

E' indubbio che la crisi finanziaria dell'ultimo biennio ha messo in crisi anche il settore vivaistico, ben più solido del settore floricolo e che fino ad oggi ha retto sul piano delle imprese e dei posti di lavoro grazie alla capitalizzazione delle aziende, alla forte propensione all'internazionalizzazione, alla specializzazione produttiva ed anche alla possibilità di effettuare decise azioni sui prezzi che però hanno ormai esaurito tutti i margini possibili.

Anche sul fronte dei consumi la floricoltura italiana accusa una certa contrazione, ancora più accentuata negli ultimi anni a seguito della crisi finanziaria mondiale. L'attuale situazione, infatti, è legata oltre che alla crisi economica anche ad uno spostamento della spesa verso altri beni di consumo che hanno dirottato la capacità di spesa dei consumatori su altri settori. La spesa media pro-capite degli italiani per l'acquisto di prodotti ornamentali è passata dai 70 euro spesi all'inizio degli anni '90 ai 47 euro spesi nel 2009 (Ismea).

In Europa il consumo pro-capite è attestato nel 2009 a euro 38 € per persona con una marcata differenza fra i paesi della vecchia Europa, dove è pari a euro 45,4 €, e quelli della nuova dove è pari a euro 9,8 €, lasciando intravedere grandi possibilità di crescita del consumo se aumenteranno i redditi delle popolazioni dei paesi che sono entrati recentemente nell'Unione.

Il settore florovivaistico è caratterizzato da intensi scambi commerciali a livello internazionale. I paesi esportatori a livello mondiale sono oltre 90 e molti di questi esportano quasi tutto il materiale prodotto su distanze ben superiori al migliaio di chilometri. L'Asia e il continente africano sono le aree dove si continua ad investire mentre in Europa le difficoltà per far fronte ai maggiori costi di produzione e alla accresciuta competitività si

scontrano con aree di consumo dove i vecchi e tradizionali schemi di vendita (negozi, mercati locali) non riescono più a stimolare gli acquisti.

Per quanto riguarda gli scambi di prodotti florovivaistici il primo mercato è l'Unione Europea con un valore delle esportazioni (intra UE + extra UE) di quasi 11 miliardi di euro nel 2008 alimentati in gran parte dai Paesi Bassi (74%) seguono l'Ecuador con circa 400 milioni, gli Stati Uniti e il Canada. In undicesima e dodicesima posizione vi sono la Cina e la Thailandia. La prima ha raddoppiato le esportazioni nel quinquennio in esame mentre con riferimento al 2003 l'aumento arriva al 135%.

Il mercato mondiale al consumo di fiori e piante si stima pari a circa 45-50 miliardi di euro e di 77 miliardi di euro se si prendono in considerazione anche le piante da giardino.

I prossimi anni vedranno un riassetto complessivo delle condizioni produttive e delle relazioni competitive fra i vari paesi europei, e soprattutto a livello mondiale. Tutto ciò in un quadro normativo che l'Unione Europea sta delineando e che è improntato alla definizione di accordi di reciproco e libero scambio a livello internazionale ed alla definizione delle norme fitosanitarie per impedire l'importazione dai paesi terzi di nuovi agenti patogeni, ma anche la loro diffusione all'interno dell'Unione Europea.

## **1.2. Il florovivaismo in Sicilia**

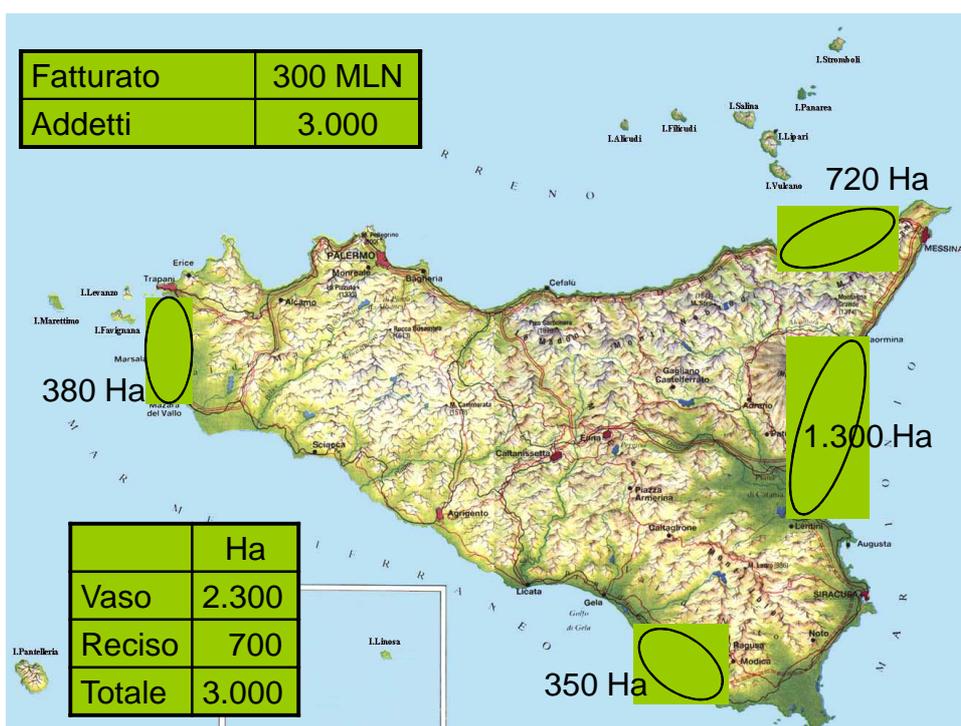
La Sicilia costituisce una delle più importanti realtà produttive in Europa per la produzione di piante ornamentali in vaso e di grandi dimensioni per l'arredo a verde di spazi esterni. Gli ettari coltivati sono circa 3.000, prevalentemente nelle aree costiere, caratterizzate da un clima mite e da

una elevata disponibilità di acqua di buona qualità. La coltivazione di piante ornamentali è prevalente con circa 2.300 ettari ed in costante aumento mentre le coltivazioni a fiore reciso interessano circa 700 ettari e sono in calo.



**Fig. 2.** Il peso del florovivaismo siciliano in Italia

L'area tirrenica della provincia di Messina, soprattutto tra Milazzo e Terme Vigliatore, è una delle aree maggiormente interessate con circa 600 ettari. Essa costituisce un'area storica del vivaismo agrumicolo ed olivicolo per gli impianti da pieno campo, che in seguito alla crisi ha convertito le produzioni a scopo ornamentale, facendo tesoro delle tradizioni e dell'esperienza acquisita. Costituisce il polo produttivo di riferimento per agrumi ed olivo ornamentale, ma non mancano anche le produzioni di piante di tipo mediterraneo come oleandro, bougainvillea, callistemon.



**Fig.3.** I principali dati del florovivaismo siciliano ed i luoghi di produzione

Nella costa Jonica tra Catania e Calatabiano nel corso degli ultimi vent'anni si è sviluppata una produzione florovivaistica di primo piano con circa 1.300 ettari e con la presenza di aziende leader a livello europeo. Le principali produzioni sono: palmizi di tutte le specie e dimensioni, bougainvillea, callistemon, gardenia ed un vasto assortimento di specie mediterranee, principalmente da vaso fiorito.

Nella Sicilia occidentale, principalmente nel comune di Marsala, ci sono circa 400 ettari, con specializzazione produttiva sulle piante verdi da interno, in particolar modo kenthie e ficus. In provincia di Ragusa, nei comuni di Vittoria, Scicli ed Acate, abbiamo circa 300 ettari coltivati prevalentemente a piante annuali in vaso fiorito. Ogni realtà territoriale ha dei connotati produttivi specifici che, determinando un elevato livello di specializzazione, attenuano la concorrenza tra le aziende. Tali aziende

evidenziano nella gestione un elevato livello d'imprenditorialità riscontrabile in pochi altri settori dell'agricoltura siciliana, essendo gestite da imprenditori giovani, con un buon livello d'istruzione, che imprimono un elevato dinamismo al settore.

Le aziende partecipano assiduamente alle più importanti fiere di settore nei principali poli fieristici europei, anche con il contributo della Regione Siciliana e delle Province regionali, sempre attente alle problematiche legate all'internazionalizzazione delle imprese.

L'innovazione è praticata in maniera continua, cambiando spesso gli orientamenti produttivi in relazione alle mutevoli richieste del mercato, introducendo innovazioni tecniche spesso derivanti da scambi d'informazione con produttori stranieri.

Il fatturato delle produzioni florovivaistiche siciliane è di circa 300 milioni di euro, che rappresenta circa il 9% del valore delle produzioni agricole siciliane compresa la zootecnia. Il florovivaismo siciliano contribuisce al totale nazionale con una quota di circa l'11%.

Un'importante quota delle produzioni finisce nei mercati al consumo europei ed una quota del 7% va in paesi extraeuropei in particolar modo nei paesi del bacino del mediterraneo e del Medio Oriente.

I paesi verso cui vengono esportate le maggiori quote di piante ornamentali sono la Germania, la Francia ed i Paesi Bassi.

### **1.3. Problemi fitopatologici emergenti nelle colture ornamentali**

Il settore delle piante da fiore e ornamentali presenta alcuni aspetti peculiari, quali l'importanza preponderante dell'aspetto estetico dei prodotti, la necessità di applicare tecniche colturali intensive e con un

elevato contenuto tecnologico, la globalizzazione del mercato, più accentuata rispetto ad altri comparti agricoli, la gamma molto vasta di specie coltivate e di tipologie di prodotto e la necessità di aggiornarla continuamente per diversificare l'offerta rispetto alla concorrenza e adeguarla alle mutevoli tendenze del mercato. La globalizzazione e la dinamicità del mercato, l'impiego di tecniche di coltivazione intensive e la molteplicità di specie coltivate sono tra i fattori che maggiormente condizionano la situazione fitosanitaria di questo comparto. Per questo motivo le malattie delle piante ornamentali sono molto numerose e spesso anche poco conosciute.

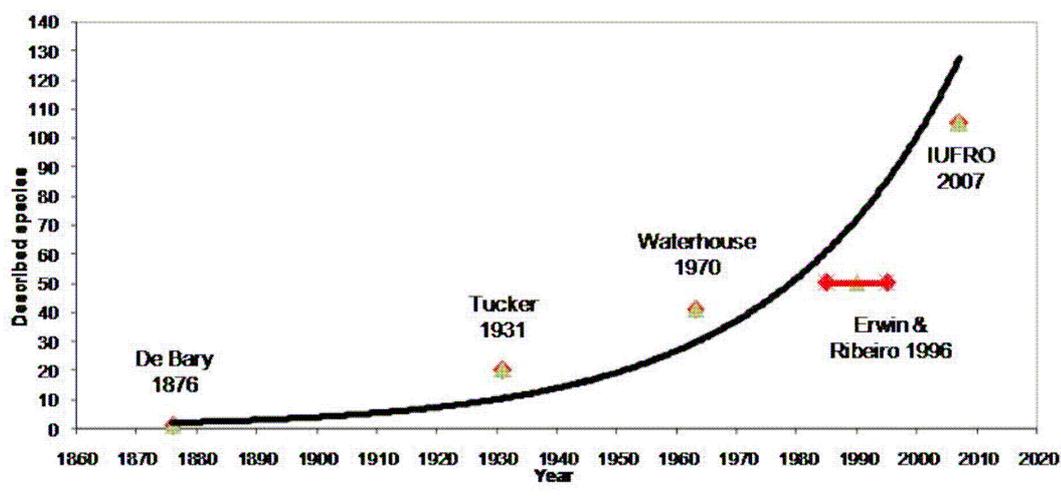
#### **1.4. I marciumi radicali da *Phytophthora* delle piante ornamentali**

Una delle malattie più diffuse nei vivai di piante ornamentali, e sotto certi aspetti anche meno nota, è il marciume radicale e del colletto da *Phytophthora* spp. Nel passato, i danni causati dalle infezioni radicali di *Phytophthora* spp. nei vivai di piante ornamentali sono stati sottovalutati, sia per le scarse conoscenze su questa malattia sia per la difficoltà di diagnosi conseguente alla mancanza di sintomi specifici e, fino a qualche anno fa, di idonee tecniche diagnostiche. Infatti, per isolare questi patogeni terricoli direttamente dai tessuti infetti non sono sufficienti i comuni substrati di coltura utilizzati per l'allevamento di microrganismi fungini, ma è necessario ricorrere all'impiego di substrati selettivi (cfr. Erwin e Ribeiro, 1996). Inoltre, è frequente il caso che nei vivai di piante ornamentali le infezioni radicali di *Phytophthora* spp. siano associate a quelle di altri funghi terricoli che ne mascherano la presenza. Infatti, le specie di *Phytophthora* rispetto ad altri microrganismi del terreno hanno

una scarsa capacità competitiva e pertanto su substrati di coltura artificiali si sviluppano più lentamente. Così, ad esempio, le infezioni di *P. nicotianae* e di *P. multivora* sulle piantine di *Polygala myrtifolia* in vaso possono passare inosservate per la concomitante presenza del marciume radicale e del colletto da *Cylindrocladium pauciramosum*, patogeno ormai ubiquitario nei vivai in cui si coltiva questa specie ornamentale. Analogamente, su mirto le infezioni al colletto di *C. scoparium* e di *P. nicotianae* spesso sono concomitanti.

### **1.5. Importanza e diffusione di *Phytophthora***

Al genere *Phytophthora* afferiscono più di un centinaio di specie, di cui circa la metà sono state descritte nel corso degli ultimi 20 anni: nel 1931 si conoscevano solo 20 specie (Tucker, 1931), nel 1990 il numero di specie note era di circa 60 (Erwin e Ribeiro, 1996), al 2007 figurano ufficialmente descritte 105 specie (IUFRO, 2007). Questo rapido incremento è da attribuire, in parte alla scoperta di nuove specie criptiche all'interno di specie note, e in parte alla scoperta di specie nuove soprattutto negli ecosistemi naturali. Stante la crescita esponenziale del numero di nuove specie descritte (Fig. 4), è presumibile che nei prossimi anni verranno scoperte e descritte da 100 a 500 nuove specie di *Phytophthora* (Brasier, 2008).



**Fig. 4.** Andamento esponenziale del numero di specie di *Phytophthora* descritte da IUFRO (2007).

Negli ultimi anni in Italia il numero di segnalazioni di nuove specie di *Phytophthora* patogene di piante ornamentali è aumentato notevolmente grazie al progresso delle tecniche diagnostiche, ma probabilmente anche in conseguenza di altri fattori. La necessità di diversificare le produzioni e la globalizzazione del mercato, ad esempio, hanno fatto sì che nel nostro paese venissero importate nuove specie vegetali provenienti da paesi tropicali o subtropicali e con i semi, ma soprattutto con le piante, sono state introdotte accidentalmente specie esotiche di *Phytophthora*. È questo il caso della *P. palmivora* o della *P. cinnamomi*, ormai frequenti, soprattutto la prima, nei vivai italiani e quello, sinora rimasto isolato, di *P. ramorum* (Cacciola *et al.*, 1998; Cacciola *et al.*, 2003; Gullino *et al.*, 2003). Altri fattori che hanno contribuito all'insediamento e alla rapida diffusione di alcune specie di *Phytophthora* nei vivai sono i seguenti: a) i flussi commerciali di piante ornamentali tra le diverse regioni; b) la forzatura e l'impiego di tecniche colturali che favoriscono lo sviluppo delle malattie causate da questi patogeni; c) l'importazione e la commercializzazione di piante in vaso; d) l'insufficienza di misure di profilassi e di adeguati

controlli fitosanitari sul materiale di propagazione, sui terricci e sui substrati colturali; e) la diffusione di specie e di varietà di piante non selezionate per la resistenza a questi patogeni; f) le caratteristiche biologiche ed epidemiologiche di alcune specie di *Phytophthora*, quali la polifagia o la capacità di produrre strutture di conservazione o di disseminazione. *P. palmivora*, ad esempio, viene disseminata facilmente dalla pioggia e dall'acqua di irrigazione perchè produce sporangi caduchi. Infatti, nei vivai in cui viene utilizzata l'irrigazione soprachioma, questa specie, pur essendo prevalentemente termofila, causa frequentemente anche infezioni fogliari. Alcuni anni fa, ad esempio, *P. palmivora* è stata segnalata come agente causale di macchie brune fogliari e marciume del germoglio centrale (*bud rot*) di piantine di *Chamaedorea elegans* allevate in vaso e successivamente è stata identificata come agente di "bud rot" di piante in vaso di *Phoenix canariensis*. Recentemente è stata segnalata insieme a *Phytophthora nicotianae* come agente di "bud and root rot" di piante in vaso di *Trachycarpus fortunei* (Cacciola *et al.*, 2011). La pioggia e l'irrigazione soprachioma contribuiscono alla disseminazione non solo di *Phytophthora* spp., ma anche di altri patogeni terricoli. Nei vivai in cui si coltivano piantine di *P. myrtifolia* in vaso, ad esempio, l'incidenza del marciume radicale e del colletto, causato da *C. pauciramosum* e occasionalmente anche da *Phytophthora* spp., è stata notevolmente ridotta eliminando la pacciamatura in plastica e sostituendola con un letto di brecciamme su cui vengono poggiati i vasi. Con questo accorgimento si evitano gli schizzi di acqua che disseminano i propaguli infettivi degli agenti causali che sono, rispettivamente, conidi e sporangi. Un altro metodo colturale con cui nei vivai di piante coltivate in vaso si può ridurre l'incidenza di malattie causate da specie terricole di *Phytophthora* o da

altri patogeni disseminati dall'acqua è quello di distanziare tra di loro i vasi. Molte specie di *Phytophthora* tra quelle più diffuse nei vivai di piante ornamentali, quali *P. cinnamomi*, *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae* e la stessa *P. palmivora*, hanno diverse centinaia di potenziali ospiti e questo aumenta la probabilità del contagio soprattutto nei vivai in cui vengono coltivate in spazi ristretti numerose specie vegetali di diversa provenienza. Inoltre, se in uno stesso vivaio vengono coltivate piante provenienti da aree geografiche distanti tra loro, è possibile che specie diverse di *Phytophthora* o "mating type" contrapposti della stessa specie vengano a contatto, dando origine attraverso ibridazione a nuove varianti più virulente o resistenti ai fungicidi. Peraltro, l'impiego intensivo di alcuni fungicidi di sintesi specifici, quali ad esempio il metalaxyl ed il suo isomero metalaxyl-m, ha già causato in Italia la selezione di popolazioni di *Phytophthora* resistenti (Pennisi *et al.*, 1998).

È probabile che l'improvvisa e pressoché contemporanea comparsa di alcune specie esotiche di *Phytophthora* nei vivai di piante ornamentali di diversi paesi europei sia la conseguenza, analogamente a quanto è accaduto per altre malattie delle piante ornamentali, di una tendenza strutturale della filiera produttiva. Il materiale di moltiplicazione, infatti, viene prodotto, sempre più frequentemente, in stabilimenti specializzati nella coltivazione di una specie vegetale o di un gruppo di specie e da qui diffuso nei vivai che producono una gamma più ampia di specie da destinare alla fase commerciale finale (Garibaldi *et al.*, 2004).

Alcune specie di *Phytophthora* sono state isolate, sino ad oggi, soltanto da uno o pochi ospiti; ciò, tuttavia, non dipende da una specializzazione patogenetica, ma indica piuttosto che sono state introdotte di recente da altre aree geografiche. Così ad esempio, *P. taxon niederhauserii*,

segnalata come agente del marciume radicale del colletto di specie di *Banksia* in Liguria (Martini *et al.*, 2007) e la cui presenza si riteneva occasionale, è stata rinvenuta anche in Sicilia su callistemo e cisto (Cacciola *et al.*, 2009). In questi ultimi anni questa specie di *Phytophthora* risulta presente in diversi paesi (Australia, Giappone, Spagna, Ungheria e Stati Uniti d'America) e la gamma degli ospiti su cui è stata segnalata comprende numerose specie quali tuja, edera, iris, cipresso di Leyland, ginepro, *Xanthorrea* spp., begonia, gloxinia, alloro, lauroceraso, *Grevillea* spp., *Ceanothus* spp., kalanchoe, *Abies nordmanniana* e cipresso di Lawson (Gloria Abad, comunicazione personale).

Analogamente *P. tentaculata*, segnalata in Campania (Cristinzio *et al.*, 2006) come agente di marciume radicale della gerbera, è stata rinvenuta più recentemente in Liguria su origano (Martini *et al.*, 2009).

La gamma degli ospiti di *P. asparagi*, segnalata inizialmente in Italia come agente causale di un marciume dell'agave (Cacciola, 2009), comprende allo stato attuale anche altre specie di *Agavaceae*, quali *Dracena* spp. e *Phormium tenax* (Badalà *et al.* 2009).

## **1.6. Caratteristiche del genere *Phytophthora***

Il genere *Phytophthora* dal greco *phyton* (pianta) e *phtheiro* (distruttore), annovera al suo interno alcuni dei patogeni più distruttivi, in grado di causare epidemie gravi e danni ingenti su diverse specie di piante, interessando diverse tipologie di ambienti: le coltivazioni di fruttiferi, di ortive, le piante ornamentali e forestali. Proprio per questo motivo tali specie patogene hanno determinato forti perdite, non solo a livello paesaggistico in ambito forestale, ma anche a livello economico,

soprattutto nel caso dei vivai e delle piante destinate all'alimentazione; ad esempio *Phytophthora infestans*, agente causale della peronospora della patata, provocò tra il 1845 e il 1849 la grande carestia irlandese.

Sebbene ancora oggi questi microrganismi vengano spesso inseriti tra gli organismi fungini in virtù del loro accrescimento filamentoso, studi di carattere genetico e biochimico hanno dimostrato la loro sostanziale diversità dai miceti, tanto che di recente sono stati classificati nel nuovo Regno dei Straminipila, insieme alle alghe brune e alle diatomee (Erwin e Ribeiro, 1996; Judelson e Blanco, 2005).

Gli anglosassoni sono soliti indicare le specie di *Phytophthora* col termine "water moulds", per sottolineare due dei caratteri distintivi di questi microrganismi e cioè la predilezione a vivere in ambienti umidi, e la differenziazione di strutture riproduttive molto simili a quelle delle alghe (Kamoun, 2003).

Le specie di *Phytophthora* appartengono alla classe degli Oomiceti, organismi che presentano numerosi caratteri morfologici e biochimici differenti dai funghi veri e propri. In particolare, hanno ife diploidi con pareti cellulari costituite da cellulosa, anziché ife aploidi o dicarion con pareti cellulari chitinose tipiche dei funghi, e accumulano micolaminarano come carboidrato di riserva al posto del glicogeno accumulato nei funghi.

Le specie di *Phytophthora* presentano un micelio ialino, ramificato, cenocitico, settato soltanto nelle colture vecchie. Il diametro delle ife dipende dalla natura fisica e chimica del mezzo di coltura e varia a seconda che il micelio sia superficiale, aereo, sommerso o nei tessuti dell'ospite; esso è in genere di 5-8  $\mu\text{m}$ . Le ife appaiono talvolta dilatate, nodose con ramificazioni perpendicolari spesso strozzate alla base. Particolari rigonfiamenti ifali sono caratteristici di alcune specie, come ad

esempio *P. cryptogea* (Ribeiro, 1978), che si differenziano da altre strutture riproduttive del fungo, quali le clamidospore, per l'assenza di un setto che li divide dall'ifa. In alcune specie i rigonfiamenti ifali si formano occasionalmente e su substrati di coltura non idonei.

La riproduzione asessuata avviene tramite sporangi e clamidospore, a seconda della specie. Gli sporangi sono portati da rami sporangiofori che non si distinguono sostanzialmente dalle ife vegetative. In alcune specie, lo sporangioforo dà origine ad un nuovo sporangio all'interno di uno sporangio vuoto (proliferazione interna), oppure continua ad accrescersi e fuoriesce attraverso il foro d'uscita e forma un secondo sporangio ad una certa distanza dal primo (proliferazione esterna). Gli sporangi presentano una elevata variabilità di forma e dimensioni, infatti possono essere sub sferici, ovoidi, limoniformi, piriformi, di colore ialino o giallo paglierino. Essi germinano direttamente con uno o più tubuli germinativi, oppure indirettamente tramite zoospore. Alcune specie presentano una papilla: zona mucillagginosa all'interno della parete dello sporangio che si imbibisce di acqua e dissolvendosi permette la fuoriuscita delle zoospore. Le zoospore emergono con movimenti ameboidi attraverso il poro di uscita. Esse sono reniformi, con due flagelli inseriti sul lato concavo. Dopo aver nuotato, per pochi minuti o per diverse ore, si incistano, perdono i flagelli, differenziano la parete cellulare e germinano mediante la formazione di un tubulo germinativo.

Particolari organi di conservazione del genere *Phytophthora* sono le clamidospore; esse sono di forma sferica oppure ovoidi, non papillate, ialine o leggermente brune, con pareti sottili o spesse, terminali o intercalari. Si distinguono dai rigonfiamenti ifali per la presenza di un setto

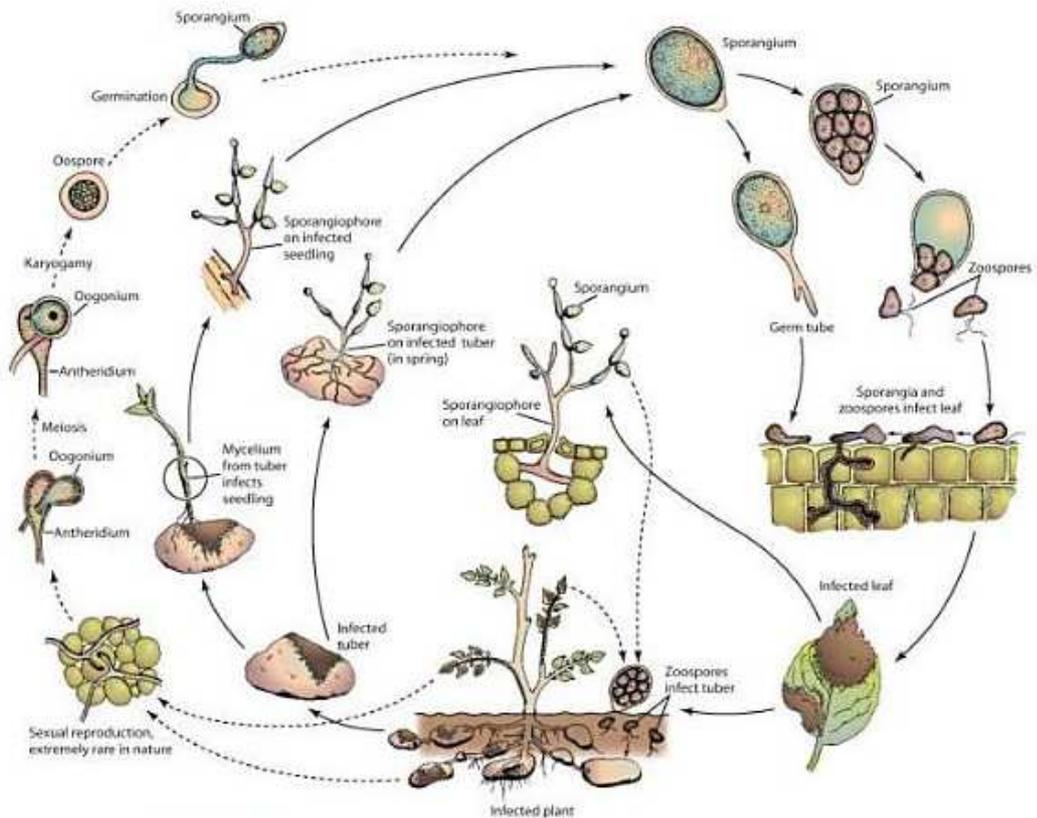
che le separa dal resto dell'ifa e dalle oospore per la loro forte birifrangenza e l'assenza di una parete distinta da quella dell'oogonio.

La riproduzione sessuale produce oospore che rappresentano delle strutture di sopravvivenza. Esse si originano dalla fusione di anteridio ed oogonio. L'oogonio, di forma sferica e piriforme, con parete liscia e di colore ialino o giallo paglierino è separato dall'ifa da un setto e racchiude una oosfera che, dopo la fertilizzazione, si trasforma in una oospora liscia, sferica che riempie parzialmente (aplerotica) o completamente (plerotica) la cavità dell'organo. L'anteridio si origina generalmente da un rigonfiamento apicale dell'ifa, che viene separato da un setto. Ne sono noti due tipi, quelli anfigini che circondano strettamente il gambo (o stipite) dell'oogonio e quelli paragini che aderiscono lateralmente all'oogonio in prossimità del gambo.

### **1.7. Ciclo biologico delle specie di *Phytophthora***

Le specie di *Phytophthora* sono eterotrofe e saprofiti. Sebbene possano crescere su substrati di coltura, in natura non sono in grado di competere con altri microbi del suolo e quindi possono essere considerati agenti patogeni delle piante obbligati, e dipendono dalla parassitizzazione delle piante per la loro sopravvivenza.

Il ciclo biologico delle specie di *Phytophthora* è costituito da uno stadio vegetativo di tipo miceliare e dalla formazione di strutture di resistenza, quali i rigonfiamenti ifali (*hyphal swelling*), le clamidospore, e le strutture riproduttive, quali sporangi, zoospore e oospore (Fig. 5)



**Figura 5.** Ciclo biologico della peronospora della patata, causata dai *Phytophthora infestans* (da Agrios, 2005, pag. 425).

Ognuna di queste strutture assolve a differenti funzioni biologiche:

- le *hyphal swelling*, si formano nel micelio in modo sia intercalare che terminale e possono avere forme variabili a seconda della specie. La funzione di queste strutture non è ancora ben conosciuta, presumibilmente costituiscono degli organi di conservazione;
- le clamidospore, sono le tipiche strutture di resistenza di forma globosa con pareti cellulari piuttosto spesse. Esse garantiscono la sopravvivenza della specie nel terreno, anche per lunghi periodi di tempo. Si formano nel micelio in modo sia terminale che intercalare assumendo forme e dimensioni molto simili fra le varie specie. In alcuni casi la forma e la

dimensione delle clamidospore può rappresentare un carattere diagnostico informativo;

- gli sporangi, sono le strutture di moltiplicazione agamica più caratteristiche delle *Phytophthorae*. Essi rivestono un ruolo chiave nell'epidemiologia delle malattie causate da questi microrganismi. La morfologia degli sporangi varia considerevolmente tra le diverse specie e rappresenta un elemento tassonomico molto importante per l'identificazione a livello di specie (Waterhouse, 1963; Erwin e Ribeiro, 1996). A tal fine vengono considerati la lunghezza, la larghezza, il rapporto lunghezza/larghezza, la presenza e la forma della papilla e del pedicello degli sporangi. Nelle specie più ancestrali infeudate ad ambienti acquatici o particolarmente umidi, gli sporangi rimangono aderenti alle ife da cui si differenziano (rami sporangiofori), mentre nelle specie più evolute gli sporangi sono decidui e una volta distaccati possono essere dispersi tramite l'acqua e/o il vento, permettendo una più efficiente disseminazione dell'inoculo rispetto alle specie con sporangi persistenti. La germinazione degli sporangi può avvenire tramite la produzione di zoospore e/o anche direttamente attraverso un tubulo germinativo. Questi due meccanismi possono variare tra le varie specie e nell'ambito della stessa specie anche in base alle condizioni ambientali;

- le zoospore, sono delle strutture biflagellate senza parete esterna. Dopo un periodo di motilità nell'acqua e dopo aver preso contatto con un ospite suscettibile si incistano, perdendo i flagelli e differenziando la parete. Se le condizioni ambientali sono favorevoli emettono un tubulo germinativo oppure occasionalmente rilasciano nuove zoospore, fenomeno quest'ultimo che prende il nome di diplanetismo. Le zoospore costituiscono il principale propagulo infettivo del genere *Phytophthora* ed

esibiscono un comportamento chemiotattico che gli permette di trovare il sito ottimale per l'infezione nella pianta ospite (es. ferite o apici radicali);

- le oospore, sono le spore sessuali che derivano dalla fusione tra i nuclei aploidi delle due strutture sessuali specializzate (gametangi), denominate rispettivamente oogoni e anteridi. L'anteridio può fecondare l'oogonio con due differenti meccanismi: nel primo denominato anfigino, l'anteridio penetra all'interno dell'oogonio avvolgendone il gambo alla base; nel secondo chiamato paragino, l'anteridio aderisce lateralmente al gambo dell'oogonio. Dopo la fecondazione si ha lo sviluppo di una singola oospora di forma circolare all'interno dell'oogonio. Le oospore sono caratterizzate dall'aver una parete particolarmente spessa che consente a queste strutture di superare condizioni ambientali sfavorevoli fungendo da spore di resistenza. Inoltre, esse rivestono una notevole importanza per la corretta identificazione e descrizione delle specie del genere *Phytophthora*, in quanto in alcuni casi possono presentare caratteristiche ornamentazioni della parete.

Alcune specie di *Phytophthora* sono omotalliche, autofertili, ossia differenziano oogoni e anteridi in singola coltura e sono in grado di auto fecondarsi. In altre specie chiamate eterotalliche, non autofertili, la fecondazione avviene in seguito all'incontro di due miceli di differente tipo sessuale "*mating type*" comunemente definiti di tipo A1 e A2.

Il processo di gametangiogamia nelle specie eterotalliche è tipicamente anfigino, in quanto il ramo oogoniale che si differenzia in prossimità di quello anteridiale, penetra entro quest'ultimo attraverso l'anteridio in modo che la struttura oogoniale risulti adagiata sull'anteridio stesso che a sua volta circonda come un anello il peduncolo su cui l'oogonio è inserito.

Le specie ootalliche possono avere gametangi con anteridi sia anfigini che paragini. In entrambi i meccanismi di gametangiogamia, i nuclei diploidi migrano dalle ife verso i gametangi dove avviene il processo meiotico che porta alla formazione di nuclei aploidi.

Successivamente, un nucleo aploide dell'anteridio si riversa nell'oogonio attraverso un tubulo fecondativo (Brasier e Sansome, 1975). Un eccesso di nuclei aploidi sia nell'oogonio che nell'anteridio spesso porta ad un aborto spontaneo delle oospore.

Il processo di riproduzione sessuale è di fondamentale importanza per lo scambio di materiale genetico all'interno delle popolazioni. Alcune specie di *Phytophthora* (per es.: *P. gonapodyides*) non sono in grado di riprodursi sessualmente, sono tuttavia in grado di stimolare la produzione di gametangi in altre specie allorché vengano a contatto (Pittis e Colhoun, 1984; Brasier *et al.*, 1993).

### **1.8. Effetti delle infezioni di *Phytophthora* sull'apparato radicale**

L'insorgere di marciumi radicali si manifesta soprattutto nelle piante che crescono in terreni eccessivamente compatti, le cui caratteristiche chimico-fisiche non permettono una sufficiente aereazione, terreni che presentano, di solito, un elevato grado di umidità per il ristagno dell'acqua ed un grado geotermico basso a causa della rallentata attività della flora microbica del terreno. Questo stato chimico-fisico e biologico del terreno incide sui processi vitali delle piante, modificando sensibilmente il loro sviluppo soprattutto per la deficienza di ossigeno in cui vengono a trovarsi le radici profonde, le quali possono perdere anche la loro vitalità per asfissia. In queste condizioni, per effetto di alcuni processi catabolici, si

accumulano nel parenchima corticale delle radici varie tossine che, circolando all'interno della pianta, riescono a ridurre l'attività metabolica provocando la scomparsa di alcuni biocatalizzatori o fitormoni ad azione specifica sullo sviluppo della radice, sull'allegagione dei fiori ecc.. La pianta, in uno stato di deperimento costituzionale, può essere più facilmente aggredita da una parte della microflora terricola, sia da alcuni funghi ad elevata attitudine saprofitaria che possono diventare aggressivi e quindi causare malattie dell'apparato radicale, sia da patogeni più specializzati ma con una minore attitudine saprofitaria, come le specie di *Phytophthora*. Inizialmente la pianta manifesta sintomi di clorosi generale, quindi si ha un deperimento organico, con riduzione di tutte le funzioni ed un disseccamento progressivo dei rametti. I sintomi caratteristici causati dalle specie di *Phytophthora* riguardano principalmente le radici ed il colletto, con la comparsa di imbrunimenti, ai quali fanno seguito dei veri e propri processi di marcescenza che possono provocare anche la morte della pianta o, nei casi meno gravi, l'emissione di nuove radici avventizie. Sul fusto, le infezioni si presentano sotto forma di lesioni brunastre, che tendono ad approfondirsi sino a raggiungere i tessuti vascolari, provocando il collasso delle parti sovrastanti.

Le piante infette da *Phytophthora* in vivaio sono spesso asintomatiche. Sono proprio queste piante che costituiscono la via con la quale più facilmente vengono diffuse le specie di *Phytophthora*. Soltanto in alcuni casi le infezioni di *Phytophthora* inducono sintomi epigei visibili e portano a morte le piante. Nel caso delle piante arboree, viceversa, sono più frequenti le infezioni latenti e il decorso delle malattie causate da specie di *Phytophthora* generalmente è cronico.

### 1.9. Strategie di difesa integrata nei confronti di *Phytophthora*

Con il “Progetto interregionale Sicilia 6/B-Settore Floricolo - Ricerca e sperimentazione applicativa, trasferimento delle innovazioni agli operatori di filiera e programmi a forte contenuto innovativo” sono stati effettuati dei lavori volti a definire anche le strategie di difesa integrata nei confronti di *Phytophthora*.

Le strategie di difesa integrata per la protezione delle colture ornamentali dal marciume radicale e del colletto da *Phytophthora* spp. in vivaio si basano sul monitoraggio dell'inoculo e sull'impiego razionale dei diversi metodi di lotta: tecniche colturali, trattamenti chimici, lotta biologica, resistenza genetica dell'ospite alle malattie ecc.

Gli esempi che seguono dimostrano come sia possibile utilizzare razionalmente le tecniche di coltivazione per prevenire o ridurre il danno causato da specie terricole di *Phytophthora*, basandosi sulla conoscenza della biologia e dell'ecologia di questi patogeni.

*P. nicotianae* è il principale agente causale del marciume radicale nelle colture di lavanda in vaso (Garibaldi *et al.*, l.c.). È stato dimostrato sperimentalmente da Minuto *et al.* (2001) che l'ombreggiamento con reti di plastica nel periodo estivo riduce l'incidenza della malattia. Secondo gli AA. citati l'ombreggiamento, abbassando di qualche grado la temperatura, creerebbe condizioni sfavorevoli a *P. nicotianae*, specie decisamente termofila. In effetti i dati sperimentali, ottenuti durante i lavori del sopracitato progetto, indicano che l'ombreggiamento non riduce la quantità di inoculo di *P. nicotianae* nel terriccio, ma determina condizioni favorevoli ad un maggiore sviluppo e vigore delle piante. Le piante sotto rete, infatti, hanno mostrato un tasso di crescita superiore del 30% rispetto

a quelle non ombreggiate. Questi risultati suggeriscono che l'ombreggiamento non ha un effetto diretto sull'inoculo, ma riduce lo "stress" ambientale rendendo così le piante di lavanda più resistenti alle infezioni radicali. E' utile ricordare che in Liguria sono state selezionate accessioni di lavanda resistenti a questa malattia. Tuttavia, poichè in Sicilia recentemente sono stati riscontrati numerosi focolai di marciume radicale e del colletto della lavanda causati da *P. palmivora* anzichè da *P. nicotianae* (Davino *et. al.*, 2002), sarebbe interessante appurare se le accessioni di lavanda resistenti alle infezioni di *P. nicotianae* lo siano anche nei confronti di quest'altra specie. In generale, la breve durata commerciale delle varietà di piante ornamentali riduce la convenienza a sviluppare strategie di lotta basate sulla selezione per la resistenza genetica alle malattie.

Una malattia che presenta delle analogie con la precedente è il marciume radicale delle piantine di dipladenia in vaso, causato anch'esso da *P. nicotianae* e che provoca danni rilevanti nella fase di trapianto. L'incidenza di questa malattia è elevata se il lotto di piantine proveniente dal vivaio di moltiplicazione è già infetto. Spesso, nei vivai di moltiplicazione la malattia non si manifesta sia per l'impiego intensivo di fungicidi sia perché non si raggiungono temperature elevate. Nella fase di trapianto, invece, lo *stress* e le lesioni radicali rendono le piante più suscettibili alle infezioni. Nel corso del citato studio è stato dimostrato sperimentalmente che nelle serre non riscaldate è possibile ridurre la moria delle piantine di dipladenia conseguente alle infezioni radicali di *P. nicotianae* anticipando, ove possibile, il trapianto all'inizio della primavera, cioè in un periodo in cui le temperature relativamente basse, soprattutto durante le ore notturne, sono

sfavorevoli a questo patogeno termofilo. È evidente, inoltre, quanto sia importante in questo caso utilizzare materiale di moltiplicazione sano.

L'esempio del marciume radicale della dipladenia dimostra l'utilità dei saggi diagnostici al fine di controllare la sanità delle piantine importate o provenienti da altri vivai. Per quanto riguarda la presenza di malattie causate da *Phytophthora* spp. sulle piantine in vaso o commercializzate con pane di terra sarebbe opportuno che fossero saggiati anche i terricci, tenuto conto dell'*habitus* terricolo di questi patogeni. I saggi possono essere effettuati con metodi microbiologici (substrati selettivi o semiselettivi ed esche vegetali), sierologici o molecolari (Cacciola *et al.*, l.c.).

Sia il marciume radicale della lavanda che il marciume radicale della dipladenia esemplificano l'importanza degli "stress" ambientali come fattori predisponenti alle infezioni di *Phytophthora* spp. Un altro esempio che evidenzia il ruolo che gli "stress" ambientali svolgono come fattori predisponenti alle infezioni di *Phytophthora* spp. è quello del marciume dell'agave, malattia riscontrata recentemente in Sicilia su *Agave attenuata* e causata da diverse specie di *Phytophthora* tra cui una nuova specie per la quale è stata proposta la denominazione di *P. asparagi* sp. nov., poichè infetta anche l'asparago coltivato. Questa malattia si manifesta in inverno per lo più in concomitanza con abbassamenti termici. Le basse temperature costituiscono soltanto un fattore predisponente alle infezioni di *P. asparagi* su *A. attenuata*, in assenza di inoculo del patogeno e di piogge la malattia, anche con temperature al disotto di 10 °C (soglia termica di *A. attenuata*), non si manifesta. La stessa malattia in estate è causata da *P. palmivora* ed è favorita dall'irrigazione soprachioma.

Un altro esempio, che documenta l'importanza dell'esatta identificazione della specie di *Phytophthora* e la possibilità di prevenzione delle infezioni con metodi colturali, è quello relativo al marciume radicale della lantana causato da *P. cryptogea*, malattia segnalata in Sicilia (Cacciola *et al.*, 2005). A differenza di *P. nicotianae*, *P. cryptogea*, che ha un *optimum* termico più basso (circa 25 °C), è attiva anche durante i mesi più freddi. Pertanto, nelle colture in vaso di lantana si può prevenire il marciume radicale da *P. cryptogea*, che si manifesta in genere all'inizio della primavera, diminuendo i volumi e la frequenza delle irrigazioni in questo periodo dell'anno ed evitando, nelle colture all'aperto, la sovrapposizione tra irrigazioni e precipitazioni piovose. In questo modo si impedisce la saturazione idrica del terreno dei vasi, che è il principale fattore predisponente alle infezioni.

I trattamenti chimici sono un altro mezzo di lotta efficace contro i marciumi radicali da *Phytophthora*. Alcuni fungicidi sono caratterizzati da attività specifica contro gli Oomiceti ed hanno un impatto ambientale relativamente basso. Tra questi ultimi, in particolare, appare promettente il fosfito di potassio ( $K_2HPO_3$ ). Questo prodotto appartiene alla categoria dei composti del fosforo, il cui meccanismo di azione sarebbe di tipo indiretto. Esso è attribuito ad alcuni metaboliti, come ad esempio l'acido fosforoso ( $H_3PO_3$ ), che si formerebbero nei tessuti delle piante trattate e che attiverrebbero le risposte difensive (Smillie *et al.*, 1990). L'acido fosforoso è anche il principale prodotto di trasformazione del Fosetyl Al, fungicida in commercio da diversi anni, che appartiene allo stesso gruppo di composti. Il fosfito di potassio ha dimostrato una notevole efficacia contro le malattie causate da specie terricole di *Phytophthora* (Coffey, 1987; Coffey e Ouimette, 1989; Hagle e Shaw, 1991; Adonia *et al.*, 1992) e da alcuni anni

viene utilizzato su larga scala in Australia contro *Phytophthora* spp. in ecosistemi protetti e in ambienti naturali (De Boer *et. al.*, 1990). Questo composto, inoltre, sembrerebbe avere un effetto stimolante sullo sviluppo radicale e sulla vegetazione. I risultati preliminari della sperimentazione in vivaio confermano l'efficacia del fosfito di potassio e di prodotti simili, somministrati per via fogliare, nella lotta al marciume radicale da *Phytophthora* spp. delle piante ornamentali.

La lotta chimica può avvalersi di composti sistemici appartenenti al gruppo dei fenilammidi (metalaxyl, furalaxyl, benalaxyl, oxadixyl) a sistemica acropeta. Altri fungicidi sistemici in uso sono i fosfonati, come Fosetyl-Al, che ha sistemica sia acropeta che basipeta. Si utilizzano anche carbammati (propamocarb), ditiocarbammati (zineb, mancozeb, tiram), sali di rame (ossicloruro di rame, idrossido di rame, solfato di rame, poltiglia bordolese).

Il valifenalate è un prodotto di nuova concezione attivo nei confronti delle malattie fogliari causate da Oomiceti, in particolare *Phytophthora* e *Plasmopara* spp. Questo principio attivo appartiene al gruppo dei CAA (Carboxylic Acid Amides), a cui appartengono anche due vanilammidi (iprovalicarb e bentiavalicarb), due ammidi dell'acido cinnamico (dimethomorph e flumorph) e il mandipropamid un ammido dell'acido mandelico (Gisi *et al.*). L'azione dei fungicidi appartenenti a questo gruppo riguarda prevalentemente l'inibizione della germinazione di oospore (azione per contatto), l'alterazione della morfologia ifale, la parziale distribuzione del citoscheletro (azione endoterapica) e l'inibizione della crescita miceliare. Essi si fissano sulle cere cuticolari, resistendo al dilavamento e diffondendosi all'interno del tessuto cellulare. Possiedono

una rapida diffusione citotropica-translaminare associata ad una blanda sistemica.

Il kyalaxyl o benalaxyl-M è invece un isomero otticamente attivo del benalaxyl, un principio attivo appartenente alla famiglia delle fenilammidi largamente usato per controllare infezioni causate da Oomiceti e in particolare da funghi appartenenti alla famiglia delle Peronosporaceae, *Phytophthora*, *Plasmopara* e *Pythium* spp.

Inoltre si stanno sperimentando alcune tecniche colturali che potranno essere utilizzate nei vivai di piante ornamentali nel contesto di strategie di difesa integrata e tra queste, oltre a quelle già menzionate, vari sistemi di irrigazione e l'impiego di diversi tipi di contenitore, ammendanti e sistemi di filtraggio delle acque di irrigazione e substrati repressivi. Questi ultimi hanno un buon tenore di sostanza organica, con alti livelli di calcio, di azoto in forma nitrica e ammoniacale, di magnesio, con buon tenore di fosfato e un pH sfavorevole al fungo. Altra tecnica in grado di abbassare le infezioni causate da questo patogeno è l'utilizzo di specie "biocide", appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae, in grado di produrre glicosinolati che, una volta miscelati ai substrati di coltivazione, reagiscono con l'acqua originando isotiocianati composti utilizzati anche nella disinfestazione chimica dei suoli agrari (es: Metham sodio che libera metil isotiocianato). Per quanto riguarda la lotta biologica può essere condotta oltre che con i citati substrati repressivi anche con consorzi di microrganismi composti da funghi simbiotici (micorrize), batteri della rizosfera (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., Attinomiceti) e funghi saprofiti (*Trichoderma* spp.).

Le micorrize (dal greco mykos: fungo, e rhiza: radice) sono associazioni simbiotiche tra le radici delle piante ed alcuni funghi del suolo. Tra i

diversi tipi di micorrize esistenti in natura, le endomicorrize o micorrize arbuscolari sono quelle che vengono utilizzate maggiormente in campo agrario. Esse incrementano le normali performance della pianta in termini di assorbimento idrico e di elementi nutritivi, ma svolgono anche un'azione indiretta di protezione della pianta nei confronti degli attacchi dei patogeni, instaurando tra l'altro interazioni sinergiche o antagonistiche con altri microrganismi della rizosfera. Le micorrize arbuscolari sono costituite da funghi che appartengono alla classe Zygomycetes; questi si caratterizzano perché producono, durante il loro ciclo vitale, strutture conosciute come arbuscoli (tutti) e vescicole (la maggioranza di essi).

Le vescicole sono organi di riserva lipidica, mentre gli arbuscoli sono le strutture responsabili del trasporto bidirezionale di nutrienti tra i simbionti, che si verifica nell'interfaccia pianta-fungo prodotta a questo livello (Franci, 1993). L'azione colonizzatrice del fungo si localizza tra l'epidermide e il parenchima corticale, non addentrandosi mai nell'endoderma, nei tessuti vascolari e meristemati (Harley e Smith, 1983); si determina così una marcata differenziazione dalle infezioni radicali di funghi patogeni, che penetrano invece nei vasi conduttori e nei meristemi.

L'effetto più importante dovuto all'azione delle micorrize arbuscolari sulle piante è un incremento dell'assorbimento di nutrienti minerali dal suolo, che si traduce in una maggiore crescita e in un maggior sviluppo delle stesse. L'espansione del micelio esterno del fungo oltre la rizosfera è il motivo principale di questo effetto, permettendo la captazione dei nutrienti al di fuori della zona d'azione delle radici. La simbiosi con la micorriza arbuscolare determina altri effetti, quali: l'aumento della resistenza della pianta allo stress idrico e alla salinità, un aumento della resistenza e/o tolleranza a determinati patogeni del suolo, un incremento della

traspirazione e un incremento della fissazione dell'azoto nelle leguminose (Gerdemann, 1968; Linderman, 1992; Smith, 1987; Roncadori, 1997).

Sulle piante micorrizzate si produce un aumento del contenuto d'acqua, che è imputabile sia ad un aumento della conduttività idrica della pianta, sia ad una diminuzione della resistenza al flusso di acqua attraverso essa.

Inoltre ciò può essere anche dovuto ad un maggiore assorbimento della rete di ife esterne della micorriza arbuscolare, estese oltre la zona alla quale il sistema radicale ha un accesso diretto. La pianta fa un migliore uso dell'acqua ed è capace di recuperare più velocemente in caso di stress idrico (Cooper, 1984). Sono stati realizzati numerosi studi nei quali si dimostra che l'inoculo artificiale con micorrize su specie di interesse agrario incrementa l'apporto nutritivo e la crescita della pianta, permettendole così di superare situazioni di stress biotico e abiotico (Calvet e Camprubi 1996 a; Francl, 1993; Perrin, 1991).

Gli effetti benefici dovuti all'introduzione dell'inoculo artificiale micorrizico risultano più evidenti nei suoli e nei substrati dove le popolazioni di funghi micorrizici nativi non esistono o sono state eliminate mediante il ricorso a pratiche agricole ostacolanti il loro sviluppo (come la fumigazione eccessiva del suolo e la coltivazione intensiva). Un altro fattore correlato ai funghi generanti micorrize arbuscolari e alla loro applicazione nasce dalle relazioni che questi instaurano con altri microrganismi che risiedono nello stesso habitat.

La micorrizosfera è la rizosfera di una pianta micorrizzata, ed è qui che si verificano le interazioni che possiamo riassumere in:

- interazione con microrganismi benefici e con funzioni specifiche;
- interazione con patogeni;

Tra i microrganismi favorevoli possiamo citare i batteri promotori della crescita vegetale (PGPR), i batteri fissatori d'azoto (sia quelli liberi che quelli simbionti), gli attinomiceti e qualche fungo saprofita che si comporta come antagonista dei patogeni del suolo e che può essere impiegato per il controllo biologico. In molti casi le interazioni stabilite sono di tipo positivo, arrivando a far registrare un effetto sinergico, in cui la presenza della micorriza e dell'altro microrganismo producono un incremento della crescita, del vigore e della capacità di difesa della pianta.

#### **1.10. Metodi di isolamento e di monitoraggio**

L'isolamento e la determinazione quantitativa dell'inoculo di *Phytophthora* nel terreno possono essere effettuati con diversi metodi. Quelli più comunemente utilizzati sono descritti brevemente.

- Le esche vegetali. Per isolare dal terreno le specie di *Phytophthora* patogene per le piante vengono utilizzati come esche frutti di limone, mele o frammenti di foglie di varie specie. Una tecnica molto nota è quella descritta da Tsao (1960), che utilizza frutti di limone. Quest'ultimi vengono messi ad incubare a contatto di quantità note di terreno opportunamente diluito con terreno sterile, in presenza di acqua, al buio ed a temperatura controllata. Le infezioni sui frutti, rilevate dopo alcuni giorni di inoculazione, indicano la presenza di inoculo di *Phytophthora* nel terreno. Questa tecnica consente di ottenere per un determinato campione di terreno un indice del potenziale di malattia che è un modo di esprimere il cosiddetto potenziale dell'inoculo. Quest'ultimo, secondo secondo la definizione di Mitchell (1979), è una misura della capacità della popolazione di un patogeno di infettare tessuti vegetali suscettibili in

condizioni ottimali per le infezioni. Successivamente il metodo di Tsao è stato parzialmente modificato da Grimm e Alexander (1973), che hanno sostituito ai limoni frammenti di foglie di agrumi. Magnano di San Lio e Perrotta (1982) a loro volta, hanno perfezionato il metodo di Grimm e Alexander, allo scopo di renderlo di più facile applicazione. La tecnica consiste nell'utilizzare, come esche, dischetti di foglie di arancio amaro del diametro di 5 mm e nel rilevare le infezioni di *Phytophthora* trasferendo i dischetti in piastre Petri contenenti un substrato di coltura selettivo.

I metodi di monitoraggio che utilizzano esche vegetali sono pratici e sufficientemente sensibili, ma poco precisi.

- I substrati di coltura selettivi. Il metodo consiste nell'inoculare su di un substrato di coltura solido una serie di diluizioni del campione di terreno in esame. Dopo 3-6 giorni di incubazione in condizioni controllate, nelle piastre inoculate con la diluizione opportuna si osserva lo sviluppo delle colonie di *Phytophthora*. Dal numero di quest'ultime, nota la quantità di terreno inoculata a quella diluizione, è possibile risalire al numero di unità che danno origine a colonie o "unità formanti colonie" (UFC). Con questo metodo viene determinata la quantità di inoculo di *Phytophthora* presente nel terreno, altrimenti definita "densità dell'inoculo" (DI), che viene espressa in numero di propaguli per grammo o per cm<sup>3</sup> di terreno.

I substrati selettivi più largamente utilizzati per determinazione quantitativa delle popolazioni di specie di *Phytophthora* patogene per gli agrumi nel terreno sono il BNPRAH (Masago *et al.*, 1977) e il PARP (Kannwischer e Mitchell, 1978). Le sigle con le quali vengono indicati questi substrati sono formate con le iniziali dei nomi degli antibiotici e dei fungicidi aggiunti al substrato colturale per renderlo selettivo.

I substrati selettivi possono essere utilizzati anche per isolare le specie di *Phytophthora* direttamente dalle radichette e valutarne così il grado di infezione. Studi recenti (Timmer *et al.*, 1989; Ippolito *et al.*, 1991) indicano che la gravità delle infezioni radicali di *P. nicotianae*, espressa come percentuale di segmenti radicali infetti, è correlata positivamente ai valori della DI. Attualmente il metodo dell'inseminazione di sospensioni di terreno su substrati di coltura selettivi è quello più largamente utilizzato per il monitoraggio dell'inoculo di *Phytophthora*.

- I saggi immunoenzimatici. Il metodo immunoenzimatico più diffuso è quello del doppio strato di anticorpi, denominato anche DAS-ELISA ("Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Essay"). In una piastra con 96 pozzetti sensibilizzati con l'anticorpo si distribuiscono i campioni da esaminare (sospensioni di terreno o estratti di radici). I pozzetti vengono quindi lavati e successivamente riempiti con una sospensione degli stessi anticorpi legati covalentemente con un enzima; il complesso anticorpo-enzima viene detto coniugato. Dopo l'incubazione ed il lavaggio si riempiono i pozzetti con il substrato specifico dell'enzima. La reazione enzimatica dà origine ad un prodotto colorato. Solo se l'antigene è presente il coniugato si lega all'anticorpo fissato alla parete del pozzetto e si osserva la reazione colorimetrica. L'intensità della colorazione è correlata alla quantità di antigene presente nel campione e può essere determinata ad occhio nudo oppure con apposite apparecchiature.

Esistono in commercio "kit" basati sul metodo ELISA, che possono essere utilizzati anche in campo per la determinazione quantitativa dell'inoculo delle specie di *Phytophthora*. Sebbene siano sensibili, semplici e rapidi questi kit non vengono utilizzati su larga scala a causa del loro costo relativamente elevato. Gli antisieri attualmente disponibili, inoltre, possono

dar luogo a reazioni incrociate con specie del genere *Pythium* e non sono specie-specifici. Essi, infatti, reagiscono con tutte le specie *Phytophthora*, ma con intensità variabile da specie a specie. Pertanto questi kit non possono essere impiegati per determinazioni strutturali e quantitative di popolazioni di *Phytophthora* costituite da specie diverse.

Questi stessi metodi diagnostici utilizzati per la determinazione quantitativa delle specie di *Phytophthora* del terreno possono essere impiegati anche per il monitoraggio dell'inoculo delle acque di irrigazione provenienti da corsi d'acqua o bacini di raccolta superficiale e in quelle reflue.

Altre tecniche diagnostiche come l'elettroforesi delle proteine miceliari e quelle basate sull'analisi degli acidi nucleici attualmente vengono impiegate quasi esclusivamente nei laboratori di ricerca e negli ultimi anni sono state utilizzate anche per la classificazione di specie di *Phytophthora*. Infatti, insieme ai criteri convenzionali basati sulle caratteristiche morfologiche e colturali vengono largamente impiegati criteri biochimici e molecolari.

#### **1.11. Valori critici della densità d'inoculo e criteri di campionamento**

Per poter utilizzare efficacemente le tecniche di monitoraggio dell'inoculo nei programmi di lotta integrata contro le malattie delle piante causate da specie di *Phytophthora*, è necessario definire i criteri di campionamento e le cosiddette soglie di pericolosità e d'intervento. Gli studi riguardanti questo aspetto indicano che le soglie di pericolosità possono variare in relazione all'età delle piante, al tipo di terreno, alla specie utilizzata come

portainnesto, al periodo stagionale ed alla specie di *Phytophthora* (Menge, 1986; Timmer *et al.*, 1988 a e b; Magnano di San Lio e Pennisi, 1994).

I valori critici di DI sono generalmente espressi in termini di numero di propaguli per gr o cm<sup>3</sup> di terreno. Secondo Sandler *et al.*, (1989), invece, per confrontare l'efficacia di trattamenti chimici e per valutare la suscettibilità dei portainnesti alle infezioni radicali di *Phytophthora* sarebbe più opportuno esprimere la DI come numero di propaguli per mg di radici, piuttosto che per unità di peso o di volume di terreno. Poiché le specie di *Phytophthora* hanno, come saprofiti, una scarsa capacità competitiva, la quantità di propaguli nel terreno è direttamente correlata all'attività patogenetica. Un valore elevato della DI, comunque essa sia espressa, corrisponde quindi ad un potenziale assoluto di malattia elevato, cioè indica condizioni favorevoli alle infezioni.

### **1.12. I metodi di diagnosi molecolare**

L'adozione e la rapida diffusione delle tecnologie molecolari in patologia vegetale hanno fornito strumenti adeguati per un rilevamento più veloce, più preciso e affidabile, e per l'identificazione e la classificazione degli agenti patogeni, risolvendo alcuni dei problemi legati ad un approccio tradizionale, ed hanno inoltre consentito di arricchire le conoscenze sulla tassonomia, sull'ecologia e sull'epidemiologia.

Fino a metà degli anni '90 le principali metodologie molecolari di diagnosi utilizzate sono stati i test sierologici, in particolare gli anticorpi monoclonali, i saggi immunoenzimatici ed i test basati sul DNA, utilizzando sonde d'ibridazione (Clark e Adams, 1977; Werres e Steffens, 1994, Dewey e Thornton, 1995; Dewey *et al.*, 1997;. Torrance, 1995; Kennedy *et al.*, 2000). Sebbene tali metodi abbiano mostrato un buon potenziale per

lo sviluppo di sistemi di rilevamento rapido (Themann e Werres, 1996;. Pettitt *et al*, 2002), sono stati sostituiti, in anni recenti, da tecnologie basate sull'amplificazione di acidi nucleici tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR), a motivo della loro maggiore sensibilità, semplicità, plasticità e velocità.

Molti dei moderni approcci si basano sulla PCR, una tecnica rivoluzionaria tramite la quale vengono copiate regioni specifiche di DNA, o amplificate milioni di volte, usando un enzima termostabile, Taq DNA polimerasi, ed effettuando cicli ripetuti di denaturazione, polimerizzazione e allungamento a diverse temperature (Mullis e Faloona, 1987).

L'identificazione avviene grazie a primers specifici che si legano al DNA del patogeno bersaglio durante la reazione. I prodotti della PCR (ampliconi) possono essere distinti per la differenza delle dimensioni e per la composizione delle sequenze di acido nucleico. La PCR ha dimostrato di essere lo strumento più sensibile per lo studio dei patogeni vegetali (Ward *et al*, 2004), in quanto è in grado di rilevare singole copie del gene bersaglio, contenute in singoli propaguli o in una miscela complessa (Lee e Taylor, 1990; Li *et al.*, 1990). La PCR è adatta per lo screening di un gran numero di campioni in qualsiasi periodo dell'anno, anche durante il periodo di bassa attività del patogeno, in tessuti legnosi dormienti o in qualsiasi altro materiale. Il fatto che non è richiesta la coltura del microrganismo riduce il tempo necessario per il test.

L'incredibile potenzialità e la versatilità delle tecnologie basate sulla PCR si manifesta nella possibilità di confrontare direttamente le regioni di DNA genomico degli organismi con una gamma di risoluzioni tassonomiche. Queste regioni di DNA depositate possono essere utilizzate per confrontare phyla, ordini, famiglie o generi, e quelle dei geni meno

frequenti nelle banche dati, per indagare specie all'interno di un genere o anche a livello tassonomico al di sotto della specie (Levesque, 2001). I vantaggi derivanti dall'utilizzo di metodi basati sulla PCR sono chiaramente connessi al contemporaneo uso ed al miglioramento delle tecniche di sequenziamento del DNA (Sanger *et al*, 1977), che hanno dato luogo ad una rapida espansione dei “database” di sequenze del DNA. Dati utili per capire le variazioni di sequenze geniche, per distinguere tra i polimorfismi dei singoli nucleotidi attribuibili a variazioni alleliche all'interno di una specie e ai polimorfismi derivanti da speciazione (es. GenBank). Per i più importanti fitopatogeni è in corso il sequenziamento dell'intero genoma: *Magnaporthe grisea* ([www.fungalgenomics.ncsu.edu](http://www.fungalgenomics.ncsu.edu)), *Botrytis cinerea* ([www.genoscope.cns.fr/externe/ English / Projets /Projet\\_W/W.html](http://www.genoscope.cns.fr/externe/English/Projets/Projet_W/W.html)); *Fusarium sporotrichioides* ([www.genome.ou.edu/ fsporo.html](http://www.genome.ou.edu/fsporo.html)); *Mycosphaerella graminicola* (<http://cogeme.ex.ac.uk>), ed anche per la *Phytophthora infestans* ([www.broad.mit.edu](http://www.broad.mit.edu)), *Phytophthora sojae* e *Phytophthora ramorum* ([www.pfgd.org](http://www.pfgd.org)).

Continui progressi tecnici degli enzimi, dei protocolli, dei primer, dei sistemi di etichettatura e degli strumenti hanno portato a miglioramenti nella sensibilità e nella specificità del rilevamento (Mumford *et al.*, 2006) e hanno prodotto nuovi ed interessanti approcci, come la nested-PCR, la determinazione simultanea di diversi organismi bersaglio (multiplexing) (Henegariu *et al.*, 1997) ed il monitoraggio diretto della reazione cinetica utilizzando la tecnologia real time PCR tramite diverse etichette fluorescenti (Heid *et al.*, 1996).

Nonostante tutto questo, la maggior parte delle tecniche basate sulla PCR hanno ancora diversi limiti per una applicazione pratica su larga scala, come potrebbe essere l'utilizzo per un programma di quarantena o per

uno studio ecologico: solo poche specie (differenti patogeni) possono essere rilevate contemporaneamente in un singolo campione, richiedono protocolli affidabili ed economici per l'estrazione del DNA da materiali non puri, condizioni rigorose per evitare la contaminazione incrociata o risultati falsi positivi durante la PCR, e semplici e veloci procedure di post-amplificazione (Yap *et al*, 1994; Martin *et al*, 2000).

Ci sono diversi vantaggi significativi nei metodi di rilevamento basati sulla PCR rispetto ai metodi tradizionali di diagnosi, ad esempio, i microrganismi non hanno bisogno di essere allevati, la possibilità di rilevare una singola molecola bersaglio in una miscela complessa, e la loro velocità e versatilità.

Nonostante questo, l'adozione della PCR per il rilevamento di routine dei patogeni delle piante è stato relativamente lento, spesso a causa di limitazioni tecniche riguardanti le procedure di post-amplificazione degli ampliconi di rilevamento.

Nested-PCR è una procedura che utilizza due serie di primer in due reazioni consecutive in grado di aumentare notevolmente la sensibilità e la specificità del rilevamento. Questa tecnologia ha dimostrato di essere particolarmente affidabile sull'amplificazione del DNA estratto da materiale ambientale (Schesser *et al*, 1991;. Mutasa *et al*, 1995; Ippolito *et al*, 2002), ma implica maggiori rischi di falsi positivi.

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

Negli ultimi anni si è assistito sia in Italia che in altri paesi europei ad una notevole diffusione di infezioni causate da specie terricole di *Phytophthora* ed i marciumi radicali e del colletto causati da questi patogeni possono considerarsi un problema emergente nei vivai di piante ornamentali e forestali. La difficoltà di isolamento, la polifagia delle specie di *Phytophthora* e i limiti alla diagnosi su base sintomatica, essendo la sintomatologia non specifica, hanno fatto sì che il fenomeno non sia stato evidenziato nella giusta misura. A questo si aggiunge che spesso le piante in vivaio con infezioni da *Phytophthora* sono asintomatiche, conseguentemente vengono spostate nello stesso vivaio o da aree geograficamente anche molto distanti tra di loro, favorendo la diffusione di questi patogeni.

In questo studio si è effettuato un monitoraggio dei marciumi radicali da *Phytophthora* nei vivai di piante ornamentali in Sicilia ed occasionalmente anche in altre regioni italiane (Liguria e Piemonte), con lo scopo di valutarne la diffusione e identificare le specie di *Phytophthora* responsabili. L'identificazione e la caratterizzazione delle specie si è basata su criteri convenzionali, quali i caratteri morfologici e colturali, ma sono stati utilizzati anche metodi molecolari (sequenziamento del DNA).

Sono stati effettuati inoltre saggi di patogenicità per alcune specie di *Phytophthora* rinvenute nel corso dello studio e sono stati sperimentati alcuni antagonisti microbici che miscelati ai terricci inibiscono le infezioni radicali di questi patogeni.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Prelievo di campioni e monitoraggio

I campioni esaminati erano costituiti prevalentemente da piante allevate in vaso. In qualche caso sono state esaminate anche piante allevate a piena terra. Alcuni campioni sono stati recapitati o spediti da vivaisti al laboratorio di fitopatologia del Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari ed Agroambientali dell'Università degli Studi di Catania, tra questi i campioni provenienti dall'Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali del CRA-FSO (ex Istituto Sperimentale per la Floricoltura di Sanremo), raccolti in Liguria e dal Piemonte. Inoltre nel periodo 2010-2012 è stato effettuato un monitoraggio più capillare nei vivai dei distretti florovivaistici, etneo e messinese, della Sicilia Orientale. I campioni sono stati prelevati nei diversi periodi stagionali, prevalentemente nei mesi autunnali.

Le piante sono state estratte dai vasi per esaminare l'apparato radicale. Le radichette separate dal terreno, erano pulite in acqua corrente e tagliate in segmenti di circa 3 mm di lunghezza. I segmenti erano inseminati in piastre Petri ( $\varnothing$  9 cm) contenenti substrato selettivo per *Phytophthora*. Le piastre erano messe ad incubare in termostato alla temperatura di  $22 \pm 2$  °C. dopo 6 giorni di incubazione le colonie di *Phytophthora* sviluppatesi dai segmenti sono state trasportate singolarmente in piastre Petri, su substrato selettivo, e da queste successivamente in substrato di coltura non selettivo. Le colonie contaminate da lieviti o batteri sono state purificate con la tecnica del "pan-cake" (Erwin e Ribeiro, 1996).

### 3.2. Substrati utilizzati per l'ottenimento degli isolati di *Phytophthora*

Per l'isolamento, l'identificazione e la caratterizzazione degli isolati di *Phytophthora* sono stati utilizzati i seguenti substrati: PDA (Patata Destrosio Agar), succo V8-CaCO<sub>3</sub> agarizzato, PDA + BNPRAH (Masago *et al.*, 1977)

Il PDA è stato preparato sciogliendo 39 grammi di prodotto liofilizzato (Difco) in un litro di acqua distillata. Questa soluzione è stata sterilizzata in autoclave per 20 minuti ad 1 atm a 120 °C.

Il V8 è un succo vegetale che viene largamente utilizzato per scopi alimentari e nei laboratori micologici come substrato colturale per la crescita e la riproduzione di specie di *Phytophthora*. Per la preparazione sono stati utilizzati 200 ml di succo V8 (V8 juice, Campbell), filtrato con garza, e 800 ml di acqua distillata. Al succo così diluito sono stati aggiunti due g/l di CaCO<sub>3</sub>. Posta in agitatore per 15 minuti, questa soluzione è stata filtrata di nuovo e poi sono stati aggiunti 12 gr/l di Agar. Le beute sono state sterilizzate in autoclave per 20 minuti ad 1 atm a 120 °C.

Il substrato selettivo PDA + BNPRAH è stato preparato miscelando i seguenti componenti:

Benomyl	0,06 g
Nistatina	0,07 g
Pentacloronitrobenzene (PNCB)	2,0 g
Rifampicina	0,03 g
Hymexazolo	0,3 ml
Ampicillina	1,5 g

I composti sono stati sciolti in 4,5 ml di etanolo assoluto e aggiunti a 300 ml di acqua distillata sterile. La miscela è stata poi aggiunta al PDA sterilizzato, alla temperatura di sopraffusione (circa 43 °C) nel rapporto di 1:10, prima di versare il substrato nelle piastre.

### **3.3. Isolamento ed identificazione delle specie di *Phytophthora* agenti di marciumi radicali di piante**

Sono stati prelevati campioni di terreno della rizosfera, di radici e di colletto da piante con sintomi di deperimento e, per confronto, da piante asintomatiche. Dalle radici e dal colletto sono stati effettuati isolamenti, utilizzando il substrato selettivo per *Phytophthora* PDA + BNPRAH (Masago *et al.*, l.c). Gli isolati ottenuti sono stati coltivati in purezza ed identificati su basi morfologiche, utilizzando le chiavi di Stamps *et al.* (1990) e di Erwin e Ribeiro (1996), ed in alcuni casi mediante sequenziamento del DNA.

#### **3.3.1. Isolamento di *Phytophthora* dal terreno**

Per l'isolamento dal terreno dell'inoculo di *Phytophthora* sono state prelevate, da ciascun vaso, tre - quattro porzioni di terreno che sono state mescolate tra loro. È stato così ottenuto un unico campione di terreno da ciascun vaso. Dopo aver eliminato pietre e residui grossolani, da ciascun campione sono stati prelevati 10 g di terreno che sono stati diluiti con acqua distillata nel rapporto di 1:10, agitando la sospensione per 15 minuti. Per prelevare la soluzione è stata utilizzata una pipetta automatica Gilson. La sospensione (1 ml) è stata deposta nella piastra, nella quale

successivamente è stato versato il substrato selettivo PDA + BNPRAH. Per ogni campione di terreno sono state preparate 4 ripetizioni (piastre). Dopo l'inoculazione le piastre sono state messe ad incubare al buio, in termostato, alla temperatura di 24 °C. Dopo 3 e 6 giorni di incubazione è stata verificata la presenza di colonie di *Phytophthora*. Dalle colonie sviluppatesi sul substrato selettivo sono state effettuate subcolture monoifali su PDA e su V8-CaCO<sub>3</sub>.

### **3.3.2. Isolamento dalle radici**

Le radici delle piante utilizzate per questo studio sono state ripulite dalla terra sotto acqua corrente ed asciugate con carta assorbente sterile, quindi sono state selezionate delle porzioni sintomatiche, ove presenti, nella zona di confine tra i tessuti sani e quelli malati. Nelle piante asintomatiche si è proceduto agli isolamenti anche in assenza di tessuti malati. Le radici sono state quindi tagliate in segmenti di 3-5 mm di lunghezza, che sono stati disinfettati immergendoli per qualche secondo in una soluzione di ipoclorito al 2% e successivamente in alcool etilico, infine sono stati sciacquati in acqua sterile e inseminate in piastre Petri, contenenti il substrato selettivo PDA + BNPRAH.

In ogni piastra sono stati inseminati 9 segmenti, disposti a raggiera, effettuando 2-5 ripetizioni (piastre) per pianta. Le piastre sono state messe ad incubare in termostato, alla temperatura di 24 °C ed esaminate giornalmente per 10 giorni, al fine di rilevare le colonie di *Phytophthora* sviluppatesi dai segmenti di radici. Dalle colonie sviluppatesi sul substrato selettivo sono state effettuate subcolture monoifali su PDA e su V8-CaCO<sub>3</sub>.

### **3.3.3. Isolamento da tessuti del fusto**

Sono stati prelevati con un bisturi 4-9 frammenti di corteccia e di legno, delle dimensioni di 4-5 mm, dalle cerchie più esterne a livello del colletto, poi sono stati disinfettati, immergendoli per qualche secondo in una soluzione di ipoclorito al 2% e successivamente in alcool etilico, infine sono stati sciacquati in acqua sterile ed inseminati in piastre Petri, contenenti il substrato selettivo PDA + BNPRAH. Per ogni pianta sono state effettuate 1-2 ripetizioni (piastre). Dalle colonie sviluppatesi sul substrato selettivo sono state effettuate subcolture monoifali su PDA e su V8-CaCO<sub>3</sub>.

### **3.4. Determinazione delle caratteristiche morfologiche e colturali degli isolati**

Gli isolati di *Phytophthora* sono stati identificati in base alla morfologia delle colonie, alle caratteristiche del micelio, alle temperature cardinali di crescita e alle caratteristiche morfologiche degli sporangi e dei gametangi, secondo i criteri convenzionali. Gli isolati sono stati confrontati con altre specie riportate in letteratura (Stamps *et al.*, l.c., Erwin e Ribeiro, l.c.).

#### **3.4.1. Tecnica per la produzione degli sporangi**

Per indurre alcuni isolati a produrre sporangi è stata utilizzata la tecnica di Chen e Zentmyer (1970). Tassellini di 1-3 mm sono stati prelevati da colture giovani (2-3 gg di età) sviluppatesi su V8-CaCO<sub>3</sub> e trasferiti in piastre Petri contenenti un sottile strato di V8 diluito (1:10). Le piastre sono

state lasciate al buio in termostato alla temperatura di 24 °C per 18-24 ore; successivamente è stato asportato con pipetta Pasteur il succo V8 e per 3-4 volte si è proceduto al lavaggio (3 volte ogni 15 minuti) utilizzando una soluzione minerale FeEDTA. Infine i tassellini sono stati interamente sommersi con un sottile strato della soluzione minerale utilizzata per il lavaggio e lasciati per 2-5 giorni alla luce (luce naturale + luce artificiale) ed alla temperatura di laboratorio (15-20 °C). Dal secondo giorno dopo il lavaggio, le piastre sono state esaminate giornalmente con uno stereo microscopio per osservare eventuali sporangi differenziatisi. La composizione della soluzione minerale, che viene utilizzata per il lavaggio, è la seguente:

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,01 M
KNO <sub>3</sub>	0,005 M
MgSO <sub>4</sub>	0,04 M

Dopo la sterilizzazione viene aggiunta una soluzione di FeEDTA, alla dose di 1 ml/l di substrato. La soluzione è stata sterilizzata mediante filtrazione con un filtro millipore da 0,22 µm. Il FeEDTA, è stato preparato con i seguenti componenti:

EDTA	13,05 g/l
KOH	7,5 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	24,9 g/l

### **3.5. Caratterizzazione molecolare**

Alcuni isolati rappresentativi delle specie di *Phytophthora* ottenute in questo studio sono stati utilizzati per il sequenziamento e l'analisi delle regioni ITS del rDNA.

#### **3.5.1. Estrazione del DNA**

L'isolamento del DNA genomico è stato effettuato con il kit commerciale "DNeasy Plant Mini" (Qiagen, Germania) che utilizza la tecnologia delle membrane di gel di silice per una purificazione del DNA totale senza estrazione organica o precipitazione con etanolo. Il micelio (circa 150 mg) è stato posto in una provetta Eppendorf da 2 ml contenente 0,2 g di granuli di quarzo (Carlo Erba) sterili, 400 µl di tampone di lisi e 4 µl di RNasi, e frantumato mediante vibromulino MM 301 (Retsch, Germany) a 25 Hz per 1 min. Le fasi successive alla macerazione del micelio sono state eseguite secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice del kit di estrazione del DNA. Il DNA genomico estratto (50 µl volume finale) è stato quantificato allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm e la sua purezza è stata stimata misurando il rapporto A260/A280 nm.

#### **3.5.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La regione ITS1-5.8S-ITS2 è stata amplificata utilizzando i primer ITS6 and ITS4 (Cooke et al., 2000). Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in una miscela dal volume finale di 25 µl e costituita da 1x tampone di PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>,

0.2 mM di ciascun dNTP, 0.5  $\mu$ M di ogni primer, 10 ng di DNA bersaglio e una 1 unità di Taq Polymerasi (Invitrogen). In tutte le reazioni di PCR è stato inserito un controllo negativo contenente acqua al posto del DNA bersaglio. Le reazioni di PCR sono state effettuate in un termociclatore (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Cetus) con il seguente programma: 3 min a 94 °C, 35 cicli della durata di 30 s a 94 °C, 50 s a 58 °C e 1 min a 72 °C; tutte le reazioni alla fine pre vedevano 10 min a 72 °C. Gli ampliconi sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1.5% contenenti il colorante SYBR Safe (Invitrogen, Life Technology Corporation, Carlsbad, CA, USA) in un tampone Tris-acetato-EDTA (TAE). Dopo la corsa elettroforetica, le bande sono state visualizzate con un trans-illuminatore a raggi UV e i gel sono stati fotografati con una camera digitale. Quindi le singole bande della dimensione attesa sono state purificate utilizzando il kit di purificazione QIAquick PCR (Qiagen).

### **3.5.3. Sequenziamento e analisi della regione ITS**

Gli ampliconi purificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni "forward" e "reverse" presso la BMR-Genomics (<http://www.bmr-genomics.it/>) e le sequenze consenso sono state analizzate con il programma DNA DYNAMO (BlueTractorSoftware Ltd; <http://www.bluetractorsoftware.co.uk>). Le sequenze ITS sono state confrontate con quelle disponibili nella banca dati genetica NCBI ([National Center for Biotechnology Information](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizzando l'algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). L'allineamento delle sequenze nucleotidiche è stato eseguito con il programma *ClustalW2*, disponibile presso il sito dell'EBI (*European Bioinformatics*

*Institute*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) utilizzando i parametri predefiniti del programma. Le sequenze ITS di alcune specie ottenute in questo studio sono state depositate in GenBank utilizzando il sistema BankIt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### **3.6. Valutazione della patogenicità degli isolati di *Phytophthora***

Per la valutazione della virulenza di alcuni isolati di *Phytophthora* ottenuti da terreno e da matrici vegetali, sono stati effettuati saggi di patogenicità. I metodi sono descritti di seguito.

#### **3.6.1. Saggi di patogenicità su *Polygala myrtifolia* – 1<sup>a</sup> prova**

Per questi saggi sono state utilizzate piantine di *Polygala myrtifolia* di 7 mesi d'età poste in vasetti di dimensione 7x7 cm riempiti con terriccio a base di torba bruna e bionda, arricchito con sostanza organica (humus di lombrico). In considerazione del fatto che due diversi patogeni sono stati trovati costantemente associati al deperimento delle piantine di *P. myrtifolia* in vivaio: l'ascomicete *Cylindrocladium pauciramosum* e l'oomicete *Phytophthora multivora*, sono stati effettuati saggi di patogenicità per chiarire il ruolo di questi due patogeni.

Sono stati utilizzati i seguenti isolati *Phytophthora multivora* (Ph Pm1) e *Cylindrocladium pauciramosum* (Cyp 23).

#### *Cylindrocladium pauciramosum*

Da colture in attivo accrescimento di *C. pauciramosum* in piastre Petri su PDA è stata ottenuta una sospensione di conidi in acqua distillata sterile

( $5 \times 10^5$  conidi  $\text{ml}^{-1}$ ). La concentrazione di conidi è stata aggiustata servendosi di un emocitometro Bürker. Le piantine sono state inoculate, effettuando con un bisturi all'altezza del colletto un'incisione superficiale nella quale sono stati inoculati 10  $\mu\text{l}$  della sospensione conidica. La restante soluzione è stata versata nel terriccio in prossimità del colletto.

#### *Phytophthora multivora*

Il micelio di isolati di *Phytophthora multivora* (Ph Pm1), allevati su PDA in capsule Petri su V8-CaCO<sub>3</sub>, dopo 5 giorni d'incubazione, è stato sospeso in acqua raschiando la superficie della colonia. Con un bisturi all'altezza del colletto della pianta è stata praticata un'incisione superficiale nella quale sono stati iniettati 10  $\mu\text{l}$  di sospensione di miceliare. La restante soluzione è stata versata nel terriccio in prossimità del colletto.

#### Testimone

Nelle tesi testimone è stata seguita la stessa procedura di inoculo effettuata per i patogeni utilizzando soltanto acqua sterile.

Le piantine sono state disposte in camera umida per 48 ore a  $24 \pm 2$  °C, suddividendole in 3 gruppi: Testimone, *Phytophthora* e *Cylindrocladium*. Successivamente sono state trasferite in cella di coltivazione. La patogenicità degli isolati è stata valutata rilevando la mortalità, l'altezza e l'incremento giornaliero in altezza delle piantine. Ciascun isolato è stato saggiato su 15 piantine, lo stesso numero di piante è stato utilizzato per il testimone.

### 3.6.2. Saggi di patogenicità su *Polygala myrtifolia* – 2<sup>a</sup> prova

Per chiarire l'effetto combinato dei due patogeni è stato effettuato un secondo saggio di patogenicità in cui *C. pauciramosum* e *P. multivora* sono stati inoculati nel terriccio sia da soli che congiuntamente.

L'inoculo di *P. multivora* è stato preparato sterilizzando (120 °C, 1 atm per 20 min) 200 g di cariossidi di frumento imbevute di V8-CaCO<sub>3</sub> divise in 10 beute da 250 ml. Dopo 72 ore ogni contenitore è stato insemato con 6 frammenti di micelio del diam di 8 mm. Le beute sono state incubate alla temperatura di 24±2 °C per 30 gg fino a quando il micelio non ha colonizzato tutto il substrato. Da colture in attivo accrescimento di *C. pauciramosum* in piastre Petri su PDA è stata ottenuta una sospensione di conidi in acqua distillata sterile (5 x 10<sup>5</sup> conidi ml<sup>-1</sup>) la sospensione, la cui concentrazione di conidi è stata aggiustata servendosi di un emocitometro Bürker, è stata inoculata in sette beute da 50 ml con 30 ml di V8, poste successivamente ad incubare a 24±2 °C per 8 giorni. L'inoculazione del terreno è stata effettuata interrando le cariossidi colonizzate con *P. multivora* (20 g) e il substrato con *C. pauciramosum* (20 ml) attorno al colletto ed a contatto con le radici di ciascuna pianta. Nelle piante testimoni è stato utilizzato substrato di coltura sterile. Le piantine sono state disposte in camera umida per 48 ore a 24±2 °C, suddividendole in 3 gruppi: *Phytophthora*, *Cylindrocladium* e *Phytophthora*+*Cylindrocladium*, e successivamente in serra. La patogenicità degli isolati è stata valutata rilevando la mortalità delle piante dopo due mesi dal trapianto. Per questi saggi sono state utilizzate piantine di *Polygala myrtifolia* di 10 mesi d'età poste in vasi di 14 cm di diametro riempiti con terriccio a base di torba

bionda, pomice e terra, arricchito con sostanza organica (letame pellettato). Per ciascuna tesi sono state utilizzate 5 piante.

### **3.6.3. Saggi di patogenicità su *Trachycarpus fortunei***

Su piante in vaso di *T. fortunei* di un anno di età è stata inoculata una sospensione di zoospore. La sospensione è stata deposta sul picciolo delle foglie più giovani del germoglio centrale. Per le piante testimone è stata utilizzata acqua sterilizzata. Tutte le piante sono state tenute in incubazione, con il 100% di umidità, a  $25\pm 2$  °C per 48 ore e poi trasferite in serra con temperature comprese tra i 24 e i 28 °C.

### **3.7. Impiego di un ammendante con attività biologica nei confronti di *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum***

In una prova sperimentale è stata valutata l'efficacia di un prodotto commerciale, Micosat F VO12 WP, a base di micorrize, batteri della rizosfera e funghi antagonisti (*Glomus* spp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Ulocladium* spp.), nei confronti di *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum*.

Per questa prova la *Polygala myrtifolia* è stata propagata per talea a metà marzo del 2012. È stato utilizzato un terriccio commerciale, a base di torba bruna e bionda arricchito con sostanza organica (humus di lombrico).

Metà delle talee sono state propagate impiegando il terriccio tal quale, mentre le altre sono state propagate in terriccio miscelato con 3 grammi per litro di Micosat F VO12 WP. Le talee sono state poste in contenitori alveolari da 104 fori. Dopo il taleaggio una parte delle talee è stata irrigata

con una soluzione contenente 3 gr/l di acidi umici e 3gr/l di Micosat F, le restanti talee sono state irrigate solo con acidi umici.

A fine maggio le piantine sono state travasate in vasi di cm 7 x 7, utilizzando solo un terriccio commerciale per la metà delle piantine che erano state allevate nel terriccio senza Micosat, ed aggiungendo il Micosat F, alla dose di 3 gr/l di terriccio, per la restante parte. Dopo il rinvaso le piantine al cui terriccio era stato aggiunto il Micosat F sono state irrigate con una soluzione contenente 3 gr/l di acidi umici e 3gr/l di Micosat F, le restanti piantine sono state irrigate solo con acidi umici.

La somministrazione in fertirrigazione della soluzione degli inoculi commerciali e di acidi umici è stata ripetuta a distanza di quindici giorni dal rinvaso, per due volte. Ad inizio ottobre del 2012, su piantine di 7 mesi di età, si è proceduto all'inoculazione dei patogeni, *P. multivora* e *C. pauciramosum*. Con un bisturi all'altezza del colletto è stato effettuato un piccolo taglio in cui sono stati inoculati 10 µl di una soluzione con una concentrazione di  $5 \times 10^5$  conidi ml<sup>-1</sup> di *C. pauciramosum* nelle tesi che prevedevano l'inoculo di questo fungo, 10 µl di una sospensione di micelio di *P. multivora* nelle tesi che prevedevano l'inoculo dell'oomicete e di acqua sterile nelle tesi testimone. La restante soluzione degli inoculi e di acqua sterile è stata versata nel terriccio di ciascuna tesi. Successivamente le piante sono state disposte in camera umida per 48 ore a 24 °C, raggruppando in tre gruppi le sei tesi, *Phytophthora*, *Cylindrocladium* e Testimone, mentre all'interno di ciascun gruppo le piante nel cui terriccio era stato aggiunto il Micosat F sono state disposte in file alterne con quelle con il solo terriccio commerciale. Per un mese dal momento dell'inoculo dei patogeni, si è provveduto a rilevare l'altezza e la mortalità delle piantine. I dati sono stati elaborati statisticamente con il

metodo dell'analisi della varianza.

### **3.8. Confronto dell'efficacia di due ammendanti con attività biologica nei confronti di *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum***

In questa prova sono stati utilizzati come ammendanti due prodotti commerciali: Micosat F VO12 WP (*Glomus* spp., *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Ulocladium* spp.) e Micostart (*Glomus* spp., *Rhizopogon* spp., *Pisolithus* spp., *Sclerotium* spp., *Trichoderma atroviride* 898 G, batteri della rizosfera). È stata valutata l'efficacia di questi prodotti nei confronti di *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum*, inoculati sia singolarmente che in combinazione tra loro. I prodotti sono stati aggiunti al substrato nella misura di 3 gr/l. Per questa prova, sono state utilizzate delle piantine di *Polygala myrtifolia* propagate per talea in contenitori alveolari da 104 fori. Dopo il travaso in vasi di cm 7 x 7 tutte le piantine sono state irrigate con una soluzione contenente 3 gr/l di acidi umici. Dopo quindici giorni si è provveduto a somministrare anche in fertirrigazione la soluzione degli inoculi commerciali e di acidi umici, entrambe alla dose di 3 gr/l.

Successivamente le piante sono state travasate in vasi di 14 cm di diametro riempiti con terriccio a base di torba bionda, pomice e terra, arricchito con sostanza organica (letame pellettato). Quando le piante avevano 10 mesi d'età si è provveduto ad inoculare i patogeni *P. multivora* e *C. pauciramosum*. Per la preparazione e l'inoculazione dei patogeni è stata utilizzata la stessa metodica descritta in precedenza nel secondo saggio di patogenicità di *Polygala myrtifolia*.

## 4. RISULTATI

### 4.1. Monitoraggio nei vivai di piante ornamentali

Nel corso di questo studio sono state identificate oltre 21 specie diverse di *Phytophthora* ottenute da 99 specie di piante ospiti (Tab.1 e Tab.2). In tutto sono state riscontrate 16 nuove combinazioni ospite-patogeno (Tab. 3)

In Sicilia, in particolare, sono stati visitati durante il monitoraggio 18 vivai di piante ornamentali (Tab.5) e sono state prelevate, per essere sottoposte ad esami di laboratorio, 163 piante di 56 specie diverse (Tab.6). Solitamente da ogni lotto di piante sono state prelevate due piante della stessa specie con sintomi ascrivibili ad infezioni da marciumi radicali ed una pianta asintomatica. In totale sono state prelevate 117 piante sintomatiche (72%) e 46 piante asintomatiche (28%). Le piante positive alla *Phytophthora* sono risultate 57, il 35% del totale prelevato; di queste, 44 erano sintomatiche e 13 asintomatiche, rispettivamente il 38% delle piante sintomatiche ed il 28% delle piante asintomatiche (Tab.4 e Fig.6).

**Tab.1.** Le specie di piante ospiti da cui sono state isolate specie di *Phytophthora*

Famiglia	Ospite	Specie di <i>Phytophthora</i>
Agavaceae	<i>Agave attenuata</i> Salm-Dyck.	<i>P. asparagi</i>
	<i>Agave victoria reginae</i> (T.Moore)	<i>P. palmivora</i>
	<i>Agave chrysantha</i> Peebles	<i>P. asparagi</i>
	<i>Dracaena draco</i> L.	<i>P. asparagi</i>
	<i>Phormium tenax</i> Forst. & Forst.	<i>P. nicotianae</i> <i>P. palmivora</i>
Alliaceae	<i>Agapanthus umbellatus</i> (L.) Hoffmanns	<i>P. nicotianae</i>
Anacardiaceae	<i>Pistacia terebinthus</i> L.	<i>P. cryptogea</i>
Apocynaceae	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	<i>P. nicotianae</i>
	<i>Mandevilla</i> (Lindl.) x <i>amabilis</i> 'Alice du Pont'	<i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>
		<i>P. citrophthora</i>
		<i>P. cryptogea</i>
		<i>P. nicotianae</i>
	<i>Mandevilla sanderi</i> (Hemsl.) Woodson 'My Fair Lady'	<i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>
		<i>P. citrophthora</i>
		<i>P. cryptogea</i>
		<i>P. nicotianae</i>
	<i>Mandevilla splendens</i> (Hook.) Woodson	<i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>
<i>P. citrophthora</i>		
<i>P. cryptogea</i>		
<i>P. nicotianae</i>		
	<i>Vinca major</i> L.	<i>P. nicotianae</i>
Araceae	<i>Anthurium andraeanum</i> André	<i>P. nicotianae</i>
Araliaceae	<i>Hedera helix</i> L.	<i>P. nicotianae</i> <i>P. palmivora</i>
Arecaceae	<i>Chamaedorea elegans</i> Mart.	<i>P. palmivora</i>
	<i>Chamaerops humilis</i> var. <i>argentea</i>	<i>P. nicotianae</i>
	<i>Howea forsteriana</i> (C. Moore & F. Muell.) Becc.	<i>P. nicotianae</i>
	<i>Phoenix canariensis</i> Hort. ex Chabaud	<i>P. palmivora</i>
	<i>Trachycarpus fortunei</i> (Hook.) H.Wendl.	<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. palmivora</i>
	<i>Washingtonia filifera</i> (Lindl.)H.Wendl.	<i>P. nicotianae</i>
Asteraceae	<i>Argyranthemum frutescens</i> (L.) Sch. Bip.	<i>P. tentaculata</i>
	<i>Dimorphotheca sinuata</i> D.C.	<i>P. cryptogea</i>
Balsaminaceae	<i>Impatiens</i> (L.) spp.	<i>P. nicotianae</i>
Bignoniaceae	<i>Pandorea jasminoides</i> (Lindl.) K. Schum	<i>P. citrophthora</i>
		<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. tropicalis</i>
Brassicaceae	<i>Iberis sempervirens</i> L.	<i>Phytophthora</i> sp.
Capparidaceae	<i>Cleome hassleriana</i> Chodat	<i>P. nicotianae</i>
Caprifoliaceae	<i>Viburnum tinus</i> L.	<i>P. cactorum</i>
		<i>P. hedraiandra</i>
		<i>P. nicotianae</i>
	<i>Weigela</i> (Thunb.) 'Victoria'	<i>P. nicotianae</i>
Cistaceae	<i>Cistus incanus</i> L.	<i>P. cryptogea</i>
		<i>P. drechsleri</i>
		<i>P. nicotianae</i>
	<i>Cistus salvifolius</i> L.	<i>P. cryptogea</i>
		<i>P. drechsleri</i>
		<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. taxon niederhauserii</i>

Convolvulaceae	<i>Convolvulus cneorum</i> L.	<i>P. capsici</i>
		<i>P. citrophthora</i>
		<i>P. cryptogea</i>
		<i>P. palmivora</i>
		<i>P. tropicalis</i>
Crassulaceae	<i>Aeonium arboreum</i> (L.) Webb & Berthel.	<i>P. nicotianae</i>
Ericaceae	<i>Arbutus unedo</i> L.	<i>P. nicotianae</i>
Escalloniaceae	<i>Escallonia laevis</i> (Vell.) Sleumer	<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. palmivora</i>
Labiatae	<i>Lavandula officinalis</i> Chaix	<i>P. cryptogea</i>
		<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. palmivora</i>
	<i>Lavandula stoechas</i> L.	<i>P. nicotianae</i>
		<i>Phytophthora</i> sp.
	<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>P. x pelgrandis</i>
		<i>P. tentaculata</i>
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>P. cryptogea</i>	
	<i>P. drechsleri</i>	
	<i>P. nicotianae</i>	
	<i>Phytophthora</i> sp.	
<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Phytophthora</i> sp.	
	<i>P. cryptogea</i>	
	<i>P. nicotianae</i>	
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>P. nicotianae</i>
	<i>Thymus x citriodorus</i> (Pers.) Schreb.	<i>P. nicotianae</i>
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i> L.	<i>P. citricola</i>
		<i>P. nicotianae</i>
Leguminosae	<i>Acacia dealbata</i> Link	<i>P. taxon niederhauserii</i>
	<i>Acacia retinodes</i> Schldl.	<i>P. nicotianae</i>
	<i>Coronilla valentina</i> L. ssp. <i>glauca</i> Batt.	<i>P. palmivora</i>
	<i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link	<i>P. citricola</i>
		<i>P. drechsleri</i>
	<i>Cytisus villosus</i> J.& C. Presl	<i>P. multivora</i>
	<i>Genista monosperma</i> (L.) Boiss.	<i>P. drechsleri</i>
<i>P. citricola</i>		
Lythraceae	<i>Cuphea ignea</i> A. DC.	<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. tropicalis</i>
Malvaceae	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	<i>P. citricola</i>
		<i>P. nicotianae</i>
Myrtaceae	<i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	<i>P. nicotianae</i>
	<i>Callistemon viminalis</i> (Sol. ex Gaertn.) G. Don ex Loud.	<i>P. taxon niederhauserii</i>
	<i>Callistephus chinensis</i> (L) Nees	<i>P. nicotianae</i>
	<i>Chamaelucium uncinatum</i> Schauer.	<i>P. cryptogea</i>
	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. citricola</i>
	<i>Feijoa sellowiana</i> O. Berg.	<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. citricola</i>
		<i>P. multivora</i>
	<i>Leptospermum scoparium</i> J.H. Forst	<i>P. plurivora</i>
	<i>Metrosideros polymorphus</i> Gaudich	<i>P. nicotianae</i>
		<i>P. nicotianae</i>
	<i>Myrtus communis</i> L.	<i>P. cactorum</i>
		<i>P. cinnamomi</i>
		<i>P. citrophthora</i>
<i>P. cryptogea</i>		
<i>P. italica</i>		
<i>P. nicotianae</i>		
<i>P. palmivora</i>		
<i>Myrtus communis</i> (L.) subsp. <i>tarentina</i>	<i>Phytophthora</i> sp.	

Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	<i>P. nicotianae</i>	
Oleaceae	<i>Forsythia viridissima</i> Lind.	<i>P. nicotianae</i>	
	<i>Olea europaea</i> L.	<i>P. megasperma</i> <i>P. palmivora</i>	
Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i> Sims.	<i>P. nicotianae</i>	
Pittosporaceae	<i>Pittosporum ralphii</i> Kirk	<i>P. nicotianae</i>	
	<i>Pittosporum tobira</i> (Thunb) Aiton	<i>P. nicotianae</i> <i>P. palmivora</i>	
	<i>Pittosporum undulatum</i> Vent.	<i>P. nicotianae</i> <i>P. palmivora</i>	
Plantaginaceae	<i>Hebe speciosa</i> (A. Cunn) J. C. Andersen	<i>Phytophthora</i> sp.	
	<i>Hebe odora</i> (Hook. f.) Cockayne	<i>P. nicotianae</i>	
	<i>Hebe odora</i> "nana" (Hook. f.) Cockayne	<i>P. nicotianae</i>	
	<i>Hebe myrtifolia</i> (Banks & Sol. ex Benth.) Cockayne	<i>P. nicotianae</i> <i>P. cryptogea</i>	
	<i>Hebe x andersonii</i> (Lindl. & Paxt.) CKn.	<i>Phytophthora</i> sp. <i>P. nicotianae</i> <i>P. palmivora</i>	
Polygalaceae	<i>Polygala myrtifolia</i> L.	<i>P. multivora</i> <i>P. nicotianae</i>	
Primulaceae	<i>Cyclamen persicum</i> Mill.	<i>P. nicotianae</i> <i>P. palmivora</i>	
Proteaceae	<i>Banksia baxteri</i> R. Br.	<i>P. taxon niederhauserii</i>	
	<i>Banksia prionotes</i> Lindl.	<i>P. taxon niederhauserii</i>	
	<i>Banksia speciosa</i> R. Br.	<i>P. cryptogea</i>	
	<i>Grevillea gracilis</i> R. Br.	<i>P. taxon niederhauserii</i>	
	<i>Grevillea rosmarinifolia</i> A. Cunn.	<i>Phytophthora</i> sp <i>P. cryptogea</i>	
	<i>Grevillea x semperflorens</i> F. E. Briggs	<i>P. nicotianae</i> ; <i>P. palmivora</i>	
Ranunculaceae	<i>Anemone coronaria</i> L.	<i>Phytophthora</i> sp	
	<i>Ranunculus asiaticus</i> L.	<i>P. nicotianae</i> <i>P. cryptogea</i>	
Rhamnaceae	<i>Ceanothus</i> L. ssp.	<i>P. nicotianae</i> <i>P. capsici</i>	
	<i>Rhamnus alaternus</i> L.	<i>P. cryptogea</i> <i>P. nicotianae</i> <i>P. palmivora</i>	
	<i>Phyllica ericoides</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	
	<i>Photinia arbutifolia</i> Lindl.	<i>P. cactorum</i>	
Rosaceae	<i>Rosa</i> (L.) spp.	<i>P. citrophthora</i>	
	<i>Coprosma baurei</i> Endl.	<i>Phytophthora</i> sp	
	<i>Gardenia augusta</i> (L) Merril.	<i>P. nicotianae</i>	
	<i>Gardenia jasminoides</i> J.Ellis	<i>P. cryptogea</i>	
	<i>Choisya ternata</i> H.B. & K.	<i>P. nicotianae</i>	
Rutaceae	<i>Citrus aurantium</i> L.	<i>Phytophthora</i> sp.	
	<i>Citrus limonia</i> (Osbeck)	<i>Phytophthora</i> sp.	
	<i>Citrus medica</i> (L.) var. <i>sarcodactylus</i>	<i>P. nicotianae</i> <i>Phytophthora</i> sp	
	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>P. citrophthora</i> <i>P. nicotianae</i> <i>P. syringae</i>	
	<i>Correa reflexa</i> (Labill.) Vent.	<i>P. nicotianae</i>	
	<i>Ruta graveolens</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	
	Sapindaceae	<i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq.	<i>P. nicotianae</i> <i>P. palmivora</i>
		<i>Lantana camara</i> L.	<i>P. cryptogea</i>

- in rosso le più recenti combinazioni ospite-patogeno

**Tab.2.** Specie di *Phytophthora* identificate in questo studio

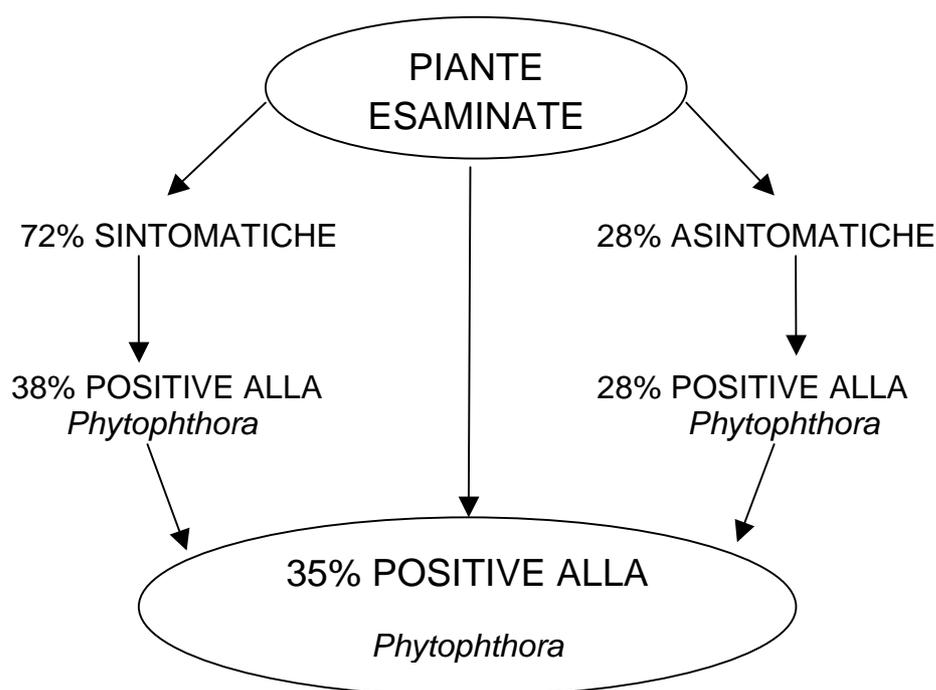
<i>P. asparagi</i>	<i>P. megasperma</i>
<i>P. cactorum</i>	<i>P. multivora</i>
<i>P. capsici</i>	<i>P. nicotianae</i>
<i>P. cinnamomi</i>	<i>P. palmivora</i>
<i>P. cinnamomi</i> var. <i>parvispora</i>	<i>P. plurivora</i>
<i>P. citricola</i>	<i>P. syringae</i>
<i>P. citrophthora</i>	<i>P. taxon niederhauserii</i>
<i>P. cryptogea</i>	<i>P. tentaculata</i>
<i>P. drechsleri</i>	<i>P. tropicalis</i>
<i>P. hedraiandra</i>	<i>P. x pelgrandis</i>
<i>P. italica</i>	

**Tab. 3.** Nuove combinazioni ospite – specie di *Phytophthora* riscontrate in questo studio

<b>Ospite</b>	<b>Specie di <i>Phytophthora</i></b>
<i>Acacia dealbata</i> Link	<i>P. taxon niederhauserii</i>
<i>Aeonium arboreum</i> (L.) Webb & Berthel.	<i>P. nicotianae</i>
<i>Banksia baxteri</i> R. Br.	<i>P. taxon niederhauserii</i>
<i>Banksia prionotes</i> Lindl.	<i>P. taxon niederhauserii</i>
<i>Banksia speciosa</i> R. Br.	<i>P. cryptogea</i>
	<i>P. taxon niederhauserii</i>
<i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	<i>P. taxon niederhauserii</i>
<i>Chamaerops humilis</i> var. <i>argentea</i>	<i>P. nicotianae</i>
<i>Cistus salvifolius</i> L.	<i>P. taxon niederhauserii</i>
<i>Dodonea viscosa</i> (L.) Jacq.	<i>P. palmivora</i>
<i>Lavandula stoechas</i> L.	<i>P. x pelgrandis</i>
<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>P. tentaculata</i>
<i>Pandorea jasminoides</i> (Lindl.) K. Schum	<i>P. citrophthora</i>
	<i>P. nicotianae</i>
	<i>P. tropicalis</i>
<i>Trachycarpus fortunei</i> (Hook.) H.Wendl.	<i>P. nicotianae</i>

**Tab. 4.** I dati del monitoraggio nei vivai siciliani

	<b>N°</b>
Vivai visitati	18
Specie di piante esaminate	56
Piante esaminate	163
Piante sintomatiche	117
Piante asintomatiche	46
Piante sintomatiche positive alla <i>Phytophthora</i>	44
Piante asintomatiche positive alla <i>Phytophthora</i>	13
Totale piante positive alla <i>Phytophthora</i>	57
Totale specie vegetali positive alla <i>Phytophthora</i>	29



**Fig.6.** Diagramma che riassume i risultati del monitoraggio nei vivai di piante ornamentali in Sicilia. Il grafico riporta le percentuali di piante sintomatiche e asintomatiche e per ciascun gruppo le percentuali di piante da cui sono stati ottenuti isolati di *Phytophthora*. In basso, la percentuale complessiva di piante da cui sono stati ottenuti isolati di *Phytophthora*. Si noti l'elevata percentuale di piante asintomatiche (circa 1/3) risultate positive al saggio.

**Tab.5.** Vivai siciliani da cui provengono i campioni esaminati

<b>AZIENDA</b>	<b>LOCALITA'</b>
Agroimpex	Fiumefreddo di Sicilia (CT)
Agrjonica	Giarre (CT)
Bonaccorso Giuseppe	Mascoli (CT)
Bougainvillea nursery	Mascoli (CT)
Fichera Salvatore	Catania
Florsicilia	Piedimonte Etneo (CT)
Giambò Piante	Furnari (ME)
Il geranio	Piedimonte Etneo (CT)
La Palmara	Terme Vigliatore (ME)
Linea Verde	Piedimonte Etneo (CT)
Mondo verde	Riposto (CT)
Patanè Alfio	c.da Linera S. Venerina (CT)
Piante del sole	Giarre (CT)
Scuderi	Mascoli(CT)
Sicilia Verde	Terme Vigliatore (ME)
Siciliafiore	Mascoli (CT)
Toscano Giuseppe	Acireale (CT)
Vivai Cubeda	c.da Linera S. Venerina (CT)

**Tab.6.** Specie di piante ospiti esaminate durante il monitoraggio nei vivai siciliani

<i>Aeonium arboreum</i> (L.) Webb & Berthel.	<i>Hebe</i> 'Wiri Charm'
<i>Agave americana</i> L.	<i>Hebe myrtifolia</i> (Banks & Sol. ex Benth.) Cockayne
<i>Agave angustifolia</i> Haw.	<i>Hebe odora</i> 'nana' (Hook. f.) Cockayne
<i>Agave chrysantha</i> Peebles	<i>Hebe odora</i> (Hook. f.) Cockayne
<i>Agave ferox</i> C. Koch	<i>Hebe x andersonii</i> (Lindl. & Paxt.) CKn.
<i>Agave victoria reginae</i> (T.Moore)	<i>Iberis sempervirens</i> L.
<i>Argyranthemum frutescens</i> (L.) Sch. Bip.	<i>Jacobinia pauciflora</i> (Nees) Lindau
<i>Armeria maritima</i> (Mill.) Willd.	<i>Lavandula officinalis</i> Chaix
<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	<i>Lavandula stoechas</i> L.
<i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	<i>Leucanthemum vulgare</i> Lam.
<i>Chamelaucium uncinatum</i> Schauer.	<i>Lotus berthelotii</i> Lowe
<i>Cistus salvifolius</i> L.	<i>Myrtus communis</i> (L.) subsp. <i>tarentina</i>
<i>Citrus aurantium</i> L.	<i>Myrtus communis</i> L.
<i>Citrus limonia</i> (Osbeck)	<i>Phylica ericoides</i> L.
<i>Citrus lumia</i> Risso & Poit.	<i>Pittosporum</i> (Banks) <i>heterophyllum</i>
<i>Citrus madurensis</i> Lour.	<i>Pittosporum tenuifolium</i> Gaertn. 'Silver Queen'
<i>Citrus medica</i> (L.) var. <i>sarcodactylus</i>	<i>Pittosporum tobira</i> (Thunb.) Aiton
<i>Coprosma baurei</i> Endl.	<i>Pittosporum tobira</i> (Thunb.) Aiton 'nanum'
<i>Cyclamens</i> (L.) Spp.	<i>Polygala myrtifolia</i> L.
<i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link	<i>Rosmarinus officinalis</i> (L.) 'prostratus'
<i>Eugenia</i> (L.) <i>myrtifolia</i> 'new port'	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
<i>Euonymus japonicus</i> Thunb.	<i>Ruta graveolens</i> L.
<i>Grevillea</i> (R. Br.) 'Poorinda Rondeau'	<i>Salvia officinalis</i> L.
<i>Grevillea gracilis</i> R. Br.	<i>Streptosolen jamesonii</i> (Benth.) Miers
<i>Grevillea juniperina</i> R.Br.	<i>Trachycarpus fortunei</i> (Hook.) H.Wendl.
<i>Grevillea lanigera</i> (A. Cunn.) 'Mt tamboritha'	<i>Viburnum tinus</i> L.
<i>Grevillea rosmarinifolia</i> A. Cunn	<i>Vinca major</i> L.
<i>Grevillea x semperflorens</i> F. E. Briggs	<i>Weigela</i> (Thunb.) 'Victoria'

La specie di *Phytophthora* più comune è risultata *P. nicotianae* isolata da 20 specie di piante ornamentali in 9 vivai, su un totale di 10 vivai in cui sono state rinvenute le diverse specie di *Phytophthora* isolate durante il monitoraggio nei vivai siciliani. In alcuni casi *P. nicotianae* è risultata nuova combinazione ospite patogeno. Infatti è stata isolata per la prima volta su *Aeonium arboreum* e *Trachycarpus fortunei* (Tab.7). La *P. nicotianae* è stata rinvenuta nel 69% delle specie di piante ornamentali risultate positive alla *Phytophthora*.

In alcuni casi questa specie è stata trovata insieme ad altre specie. Così ad esempio, in un vivaio della Sicilia Orientale è stata rinvenuta, su piante di 3 anni di età di *Trachycarpus fortunei* allevate in vaso, insieme a *P. palmivora* (Fig. 7). La percentuale degli isolamenti positivi, in questo caso è stata dell'80% e del 40% rispettivamente per *P. palmivora* e *P. nicotianae*.

L'identificazione degli isolati è stata confermata mediante sequenziamento del DNA. Le regioni ITS dell'rDNA, di due isolati rappresentativi di *P. palmivora* ottenuti da *T. fortunei* (IMI 398987 e IMI 398988), sono stati amplificati con i primer ITS6 e ITS4 e sequenziati. Il confronto delle sequenze (GenBank Accession No. HQ596556 e HQ596558) ha mostrato il 99% d'identità con le sequenze di due isolati di riferimento di *P. palmivora* (GenBank Accession No. GQ398157.1 e GU258862).

Anche per *P. nicotianae* il confronto di un isolato rappresentativo ottenuto da *T. fortunei*, IMI 398989 (GenBank Accession No. HQ596557), ha mostrato il 99% d'identità con la sequenza di un isolato di riferimento di *P. nicotianae* (GenBank Accession No. EU3310891).

Altre nuove combinazioni ospite patogeno, oltre a quelle precedentemente citate e relative al monitoraggio in territorio siciliano, sono in corso di verifica.

Altre specie di *Phytophthora* sono state rinvenute occasionalmente. Per esempio in un vivaio nel comune di Santa Venerina (CT) su *Agave chrysantha* è stata isolata *P. asparagi*. In un altro vivaio nel comune di Santa Venerina (CT) su *Rosmarinus officinalis* è stata isolata *P. cryptogea* (Tab 7). Nel corso del monitoraggio sono stati ottenuti anche isolati di specie di *Phytophthora* non ancora identificate.



**Fig.7.** Marciume del germoglio centrale di una pianta di *Trachycarpus fortunei* causato da *Phytophthora nicotianae* e *P. palmivora*

**Tab. 7.** Tabella riassuntiva del monitoraggio nei vivai siciliani

Famiglia	Ospite	Specie di <i>Phytophthora</i>	Nome isolato <sup>(1)</sup>	Matrice	Nuova segnalazione	Vivaio	Località	Stagione – Anno	
Agavaceae	<i>Agave chrysantha</i> Peebles	<i>Phytophthora asparagi</i>	Ph Agave 1/2010; Ph Agave 2/2010	Radice	-	Patanè Alfio	S. Venerina (CT)	Primavera 2010	
Apocynaceae	<i>Vinca major</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	VIN.1_Ca; VIN.2_Sa, b	Suolo	-	Il Geranio	Piedimonte Etneo (CT)	Estate 2010	
Arecaceae	<i>Trachycarpus fortunei</i> (Hook.) H.Wendl.	<i>P. nicotianae</i>	IMI 398989	Radice	+	Fichera Salvatore	Catania	Estate 2010	
		<i>P. palmivora</i>	IMI 398987; 398988		-				
Brassicaceae	<i>Iberis sempervirens</i> L.	<i>Phytophthora</i> sp	35 Ca, b, c	Colletto	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Estate 2011	
Caprifoliaceae	<i>Weigela</i> (Thunb.) 'Victoria'	<i>P. nicotianae</i>	WVRA; WVRS1 D/E	Radice	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012	
Cistaceae	<i>Cistus salvifolius</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	CSRS1; CSCS1 a, b; CSRA; CSCA	Radice Colletto	-	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012	
Crassulaceae	<i>Aeonium arboreum</i> (L.) Webb & Berthel.	<i>P. nicotianae</i>	MagRa Sicilia 2009	Radice	+	Patanè Alfio	S. Venerina (CT)	Estate 2009	
Labiatae	<i>Lavandula officinalis</i> Chaix	<i>P. nicotianae</i>	Lav. Coll.a,b,c; LAV.1_Ca; LAV.2_Ra, b	Radice Colletto	-	Il geranio	Piedimonte Etneo (CT)	Estate 2010	
	<i>Lavandula stoechas</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	22 Sa, b, c; 23 C; 23 Ra,b; 24 C; 24 Ra,b	Suolo Radice Colletto	-	Linea Verde	Piedimonte Etneo (CT)	Estate 2011	
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.		<i>P. cryptogea</i>	Ph ros Cubeda 1a-Ph ros Cubeda 1f; Ph ros Cubeda 2a-Ph ros Cubeda 2f	Colletto Suolo	-	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Primavera 2010
			<i>Phytophthora</i> sp.	Rosm. Suolo d	Colletto Suolo	-	Il geranio	Piedimonte Etneo (CT)	Primavera 2010
				ROSM Sa	Suolo	-	Il Geranio	Piedimonte Etneo (CT)	Autunno 2010
				26 Sa, b, c, (d); 26 Ca, b, c	Colletto Suolo	-	Linea Verde	Piedimonte Etneo (CT)	Estate 2011
				27 Ra,b, c; 27 Ca, b; 27 Sa, b, c, (d)	Radice Colletto Suolo	-	Linea Verde	Piedimonte Etneo (CT)	Estate 2011
	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Phytophthora</i> sp.	SORS1 a, b; SOCS1 a, b	Radice Colletto	-	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012	

Myrtaceae	<i>Callistemon citrinus</i> (Curtis) Skeels	<i>P. nicotianae</i>	CCRA a, b	Radice	-	Mondo verde	Riposto (CT)	Estate 2012
	<i>Chamelaucium uncinatum</i> Schauer.	<i>P. nicotianae</i>	Cham. Ca	Colletto	+	Agroimpex	Fiumefreddo di Sicilia (CT)	Primavera 2010
	<i>Myrtus communis</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	PhMirto1-PhMirto8	Radici	-	Patanè Alfio	S. Venerina (CT)	Estate 2010
	<i>Myrtus communis</i> (L.) subsp. <i>tarentina</i>	<i>P. nicotianae</i>	MIRTO_Sa	Suolo	-	Mondo verde	Riposto (CT)	Estate 2010
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy	<i>P. nicotianae</i>	PhB1a PhB1b PhB1c PhB1d	Radice	-	Bougainvillea nursery	Mascalì(CT)	Estate 2010
Plantaginaceae	<i>Hebe odora</i> (Hook. f.) Cockayne	<i>P. nicotianae</i>	HVBCA1; HVBCA2; HVBCS; HVBRS2	Colletto Radice	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012
	<i>Hebe odora</i> 'nana' (Hook. f.) Cockayne	<i>P. nicotianae</i>	HVNARA A/B	Radice	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012
	<i>Hebe myrtifolia</i> (Banks & Sol. ex Benth.) Cockayne	<i>P. nicotianae</i>	HVMRA	Radice	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012
	<i>Hebe x andersonii</i> (Lindl. & Paxt.) CKn.	<i>Phytophthora</i> sp.	8 Ra, b, c, d; 8 Ca; 9 Ra, b, c; 9 Ca; 7Ca	Radice Colletto	-	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Inverno 2011
			7 Sa	Suolo	-	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Inverno 2011
Polygalaceae	<i>Polygala myrtifolia</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	PMCS1 b a; PMCS2 a b	Colletto	-	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012
Proteaceae	<i>Grevillea gracilis</i> R. Br.	<i>Phytophthora</i> sp.	GGRS1 a, b; GGCS1; GGRS2	Colletto Radice	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012
	<i>Grevillea x semperflorens</i> F. E. Briggs	<i>Phytophthora</i> sp.	GXSRS1a,b; GXSCS1; GXRS2a,b; GXSCS2	Colletto Radice	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012
Rhamnaceae	<i>Phylla ericoides</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	PERA a, b	Radice	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012
Rubiaceae	<i>Coprosma baurei</i> Endl.	<i>Phytophthora</i> sp.	37 Sa, b; 37 Ca, b; 39 Ra, b; 39 Sa, b; 39 C	Radice Colletto Suolo	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Estate 2011
Rutaceae			<i>Citrus aurantium</i> L.	<i>Phytophthora</i> sp.	A.A-I anno suolo; A.A-II anno suolo	Suolo	-	Scuderi
	<i>Citrus limonia</i> (Osbeck)	<i>Phytophthora</i> sp.	LIM. ROSS_Rb, e, f	Radice	-	Giambò Piante	Furnari (ME)	Estate 2010
	<i>Citrus medica</i> (L.) var. <i>sarcodactylus</i>	<i>P. nicotianae</i>	BUD.1-Cb	Colletto	-	Giambò Piante	Furnari (ME)	Estate 2010
	<i>Ruta graveolens</i> L.	<i>P. nicotianae</i>	RGRS1a,b; RGCS1; RGRS2a,b; RGCS2; RGRA	Colletto Radice	+	Vivai Cubeda	S. Venerina (CT)	Autunno 2012

(1) Il nome indica la sigla con cui l'isolato è stato conservato presso la collezione del Dipartimento di Gestione dei Sistemi Agroalimentari ed Agroambientali dell'Università degli Studi di Catania.



**Fig. 8.** Panoramica di due vivai in provincia di Catania, nel versante orientale dell'Etna, oggetto del monitoraggio. (a) Agroimpex, Fiumefreddo di Sicilia (CT). (b) Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT)



**Fig. 9.**

(a) Coltivazione di piante officinali in vaso. Vivaio Il Geranio, Piedimonte Etneo (CT).

(b) Disseccamento di piante di *Lavandula officinalis* causato da infezioni radicali e del colletto di *Phytophthora nicotianae*, osservato in estate. Vivaio Il Geranio, Piedimonte Etneo (CT).

(c) Piante in vaso di *Rosmarinus officinalis*. Si noti sulla sinistra pianta asintomatica e sulla destra due piante che manifestano in primavera sintomi di avvizzimento causati da infezioni radicali e del colletto di *P. cryptogea*. Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT).



**Fig. 10.**

(a) Ingiallimenti e avvizzimenti di piante di *Chamaelaucium uncinatum*, notati in primavera. Vivaio Agroimpex, Fiumefreddo di Sicilia (CT).

(b) Sintomi iniziali di deperimento su pianta di *Chamaelaucium uncinatum* causati da infezioni al colletto di *Phytophthora nicotianae*. Vivaio Agroimpex, Fiumefreddo di Sicilia (CT).

(c) Moria, osservata nella stagione estiva, di piantine di *Myrtus communis* subsp. *tarentina* causata da *P. nicotianae*. Vivaio Mondoverde, Riposto (CT).



**Fig. 11.**

(a) *Trachycarpus fortunei* in coltivazione presso il vivaio Siciliainfiore, Mascali (CT).

(b) Piante di *Trachycarpus fortunei* pronte per essere smaltite, con sintomi di marciume del germoglio centrale e delle radici causati da *Phytophthora nicotianae* e *P. palmivora*. Vivaio Siciliainfiore, Mascali (CT).

(c) Marciume del germoglio centrale di piante in vaso di *Chamaerops humilis* var. *argentea* causato da *P. nicotianae*, in autunno. Vivaio Fichera, Catania.



**Fig. 12.**

(a) Marciumi del colletto causati da *Phytophthora nicotianae* su piante di *Ruta graveolens* osservati in autunno. Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT).

(b) Piantine di *Polygala myrtifolia* dove si sono osservati in autunno evidenti sintomi di avvizzimento causato da infezioni al colletto di *P. nicotianae*. Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT).

(c) Piante di *Coprosma baueri* con evidenti sintomi di avvizzimento della chioma causato da *Phytophthora* sp. Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT).



**Fig. 13.**

Piante monitorate in autunno presso i Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT). In ogni foto si notano due piante sintomatiche ed una asintomatica.

(a) Disseccamenti su *Salvia officinalis* causati da infezioni radicali ed al colletto di *Phytophthora* sp.

(b) Disseccamenti su *Cistus salvifolius* causati da infezioni radicali ed al colletto di *P. nicotianae*.

(c) Disseccamenti su *Grevillea x semperflorens* causati da infezioni radicali ed al colletto di *Phytophthora* sp.

(d) Disseccamenti su *Grevillea gracilis* causati da infezioni radicali ed al colletto di *Phytophthora* sp.



**Fig. 14.**

Piante in vaso di specie diverse di *Hebe* raccolte in inverno (a) ed in autunno (b,c e d) presso i Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT). In ogni foto ci sono due piante sintomatiche ed una asintomatica.

(a) Crescita stentata e disseccamenti di *Hebe x andersonii* causati da infezioni radicali ed al colletto di *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora* sp.

(b) Disseccamenti di piante di *Hebe myrtifolia* causate da infezioni radicali di *P. nicotianae*.

(c) Disseccamenti di piante di *Hebe odora* causati da infezioni radicali e del colletto di *P. nicotianae*.

(d) Disseccamenti di piante di *Hebe odora* "nana" causati da infezioni radicali di *P. nicotianae*.



**Fig. 15.**

(a) Piante in vaso di *Agave* spp. in coltivazione presso il vivaio Patanè Alfio, Santa Venerina (CT), che mostrano in primavera sintomi di marciume del germoglio centrale e di avvizzimento causati su *Agave chrysantha* da *Phytophthora asparagi*.

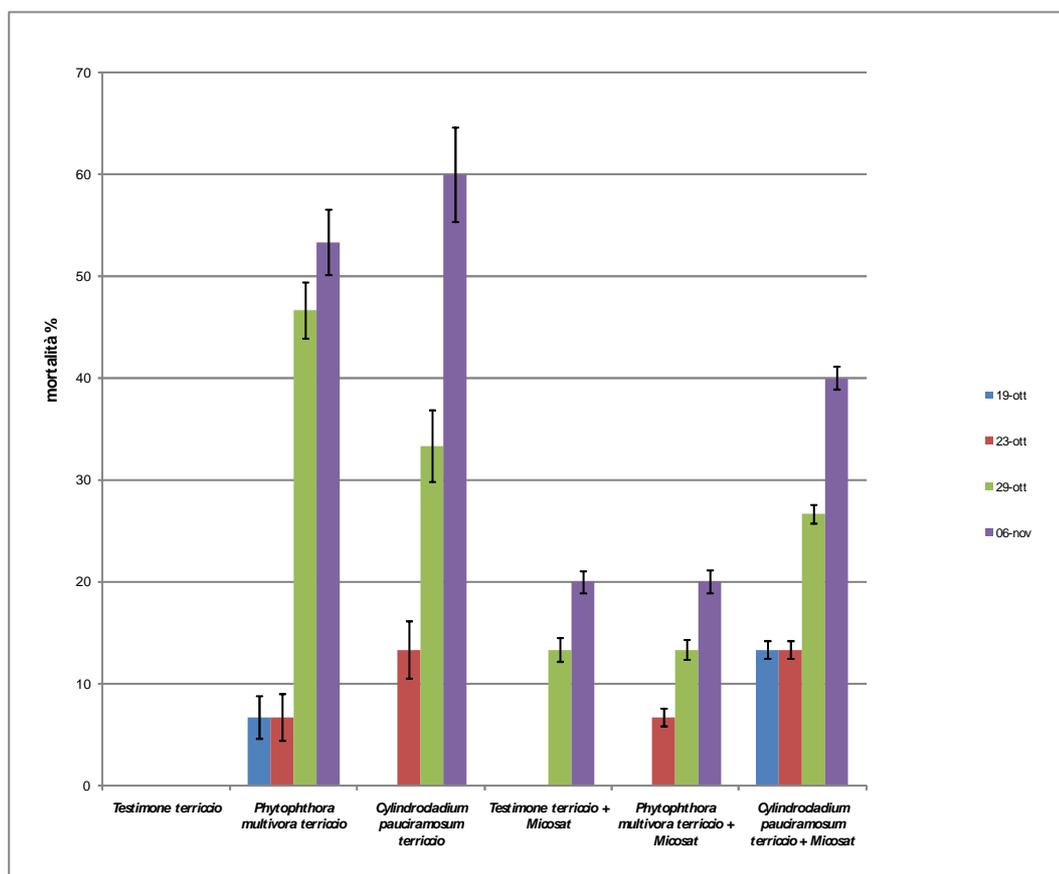
(b) Sulla sinistra disseccamenti di *Weigela 'Victoria'* conseguenti ad infezioni radicali di *P. nicotianae*. Autunno - Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT).

(c) Sulla sinistra piante di *Philica ericoides* con sintomi di avvizzimento conseguenti ad infezioni radicali di *P. nicotianae*. Sulla destra pianta asintomatica. Autunno - Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT).

(d) Sulla destra piante di *Iberis sempervirens* con evidenti sintomi di avvizzimento conseguenti ad infezioni al colletto di *Phytophthora* sp. Sulla destra pianta asintomatica. Estate - Vivai Cubeda, Santa Venerina (CT).

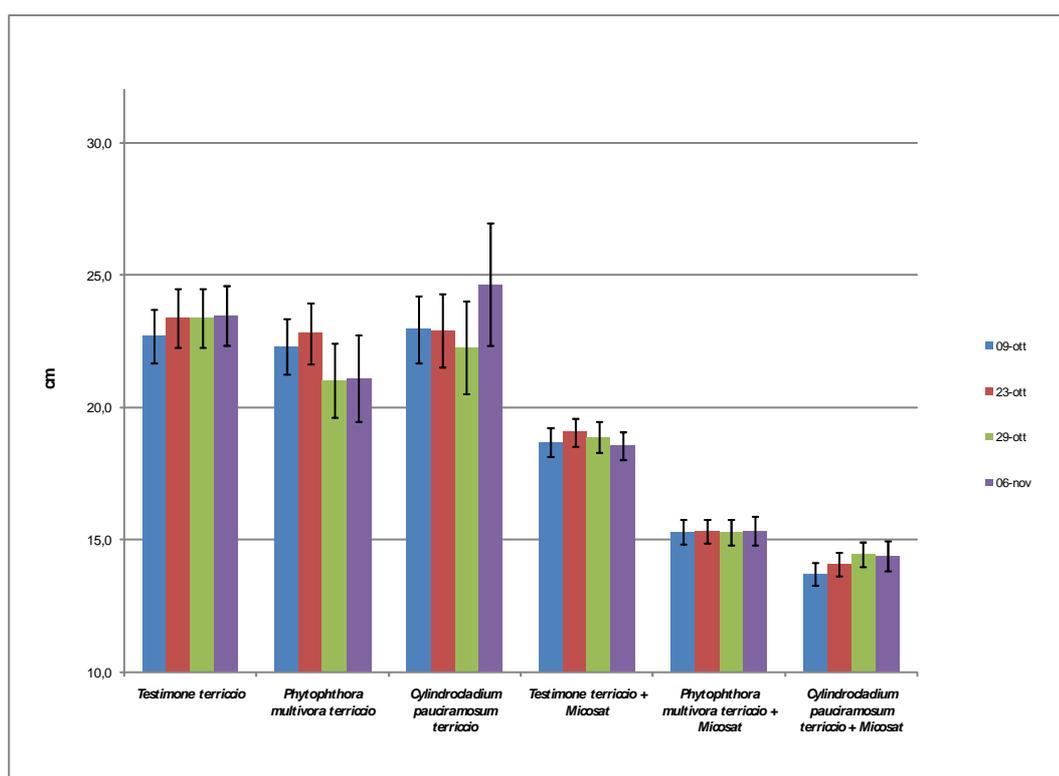
## 4.2. Saggi di patogenicità su *Polygala Myrtifolia* – 1<sup>a</sup> prova

La prova di inoculazione artificiale di piante di *Polygala myrtifolia* con *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum* ha messo in evidenza la virulenza di questi due patogeni. Entrambi infatti hanno determinato una mortalità elevata delle piantine, 53% e 60% rispettivamente per *P. multivora* e *C. pauciramosum*, con differenze statisticamente non significative tra di loro, mentre nel testimone la mortalità è stata nulla (Fig.16). Entrambi i patogeni sono stati reisolati dalle piante inoculate artificialmente.



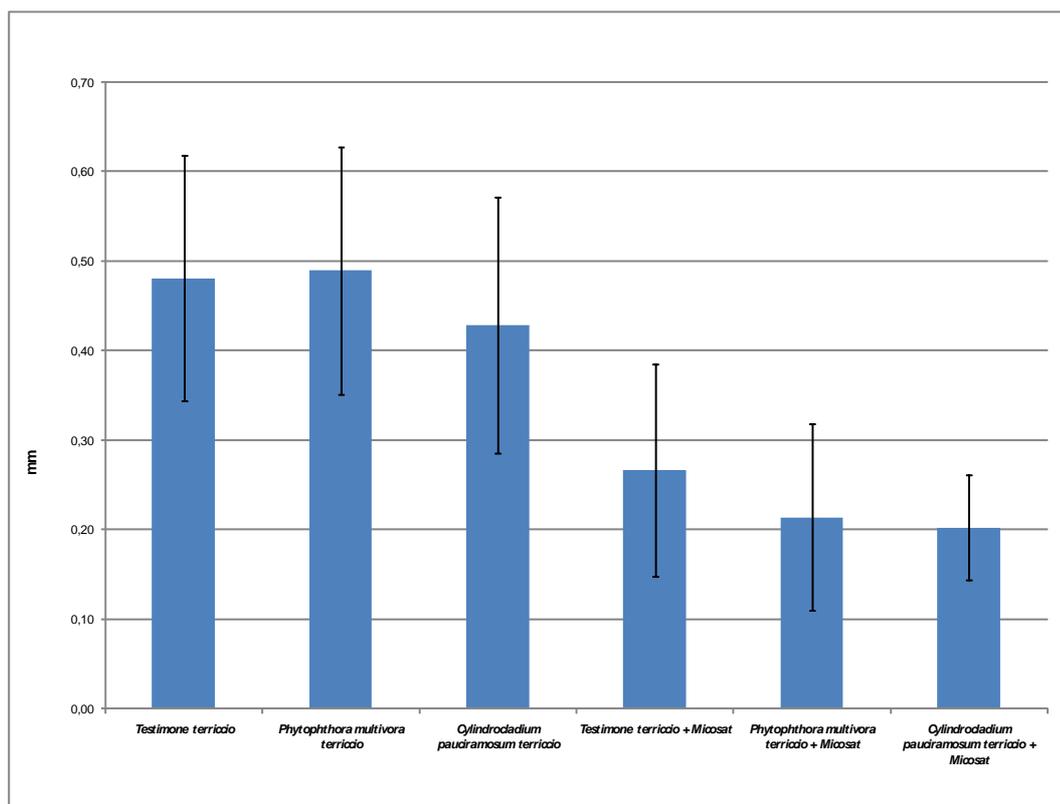
**Fig. 16.** Mortalità (%) delle piantine di *Polygala myrtifolia* inoculate con *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum* e ammendate con Micosat. I rilievi sono stati effettuati a diversi intervalli di tempo (10, 14, 20 e 28 giorni) dopo l'inoculazione.

Non ci sono differenze statisticamente significative di altezza tra la tesi *C. pauciramosum* terriccio e le altre due tesi con terriccio, mentre c'è una differenza significativa tra la tesi testimone terriccio e *P. multivora* terriccio, che negli ultimi rilievi presenta un rallentamento di crescita per deperimento dell'apparato radicale. (fig. 17).



**Fig.17.** Altezza delle piantine di *Polygala myrtifolia* inoculate con *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum* e ammendate con Micosat. I rilievi sono stati effettuati a diversi intervalli di tempo (10, 14, 20 e 28 giorni) dopo l'inoculazione.

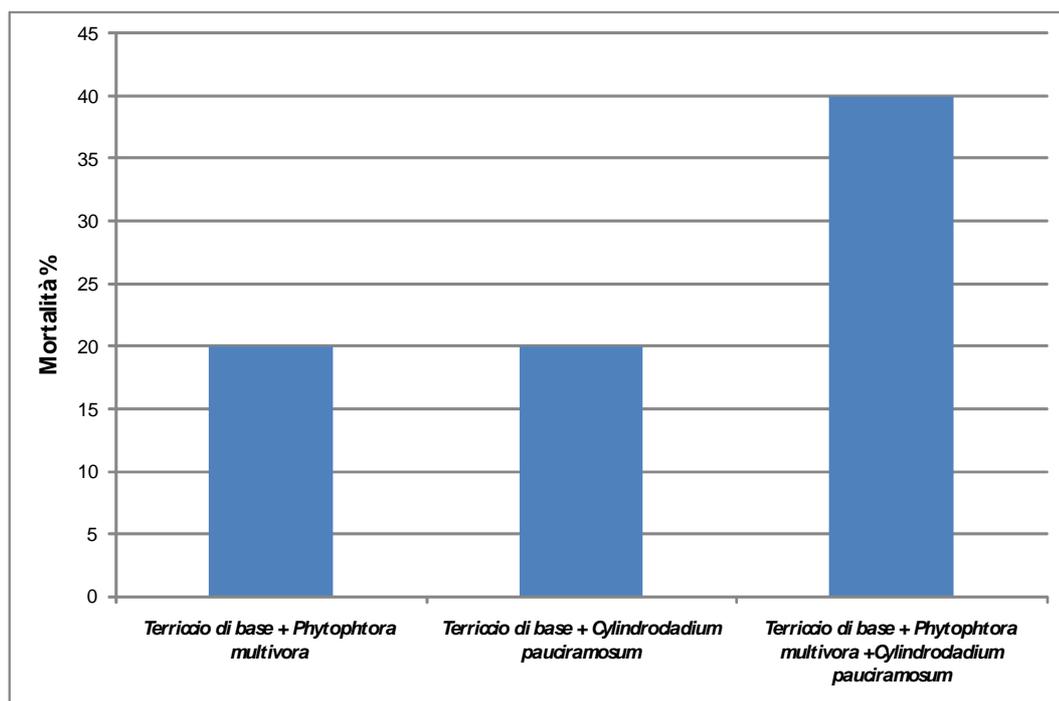
L'incremento giornaliero in altezza, circa 0,5 mm/giorno, non presenta differenze statisticamente significative tra le tesi con solo terriccio (Fig.18).



**Fig.18.** Effetto del Micosat sulla crescita delle piantine di *Polygala myrtifolia* inoculate con *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum*. Gli istogrammi rappresentano l'incremento giornaliero di altezza delle piantine.

#### 4.3. Saggi di patogenicità su *Polygala Myrtifolia* – 2<sup>a</sup> prova

Nel saggio in cui i patogeni, *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum*, sono stati inoculati insieme si è registrata una mortalità doppia (40%), rispetto alle tesi in cui i patogeni sono stati inoculati singolarmente (20%) (Fig. 19). Entrambi i patogeni sono stati reisolati dalle piante inoculate artificialmente.



**Fig. 19.** Esito delle inoculazioni radicali di piantine di *Polygala myrtifolia* con *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum*, singolarmente e insieme. Gli istogrammi rappresentano la percentuale di mortalità due mesi dopo il trapianto nel terriccio infestato dai due patogeni.

#### 4.4. Saggi di patogenicità su *Trachycarpus fortunei*

I saggi di patogenicità eseguiti, inoculando su piante in vaso di *T. fortunei* di un anno di età una sospensione di zoospore di *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora palmivora*, hanno dato esito positivo in entrambi i casi. Dopo tre settimane le piante hanno mostrato marciume del germoglio centrale che successivamente si è esteso al fusto e alla radice. Le piante testimone sono rimaste sane. Entrambe le specie di *Phytophthora* sono state reisolte dalle piante inoculate artificialmente.

#### **4.5. Impiego di un ammendante con attività biologica nei confronti di *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum***

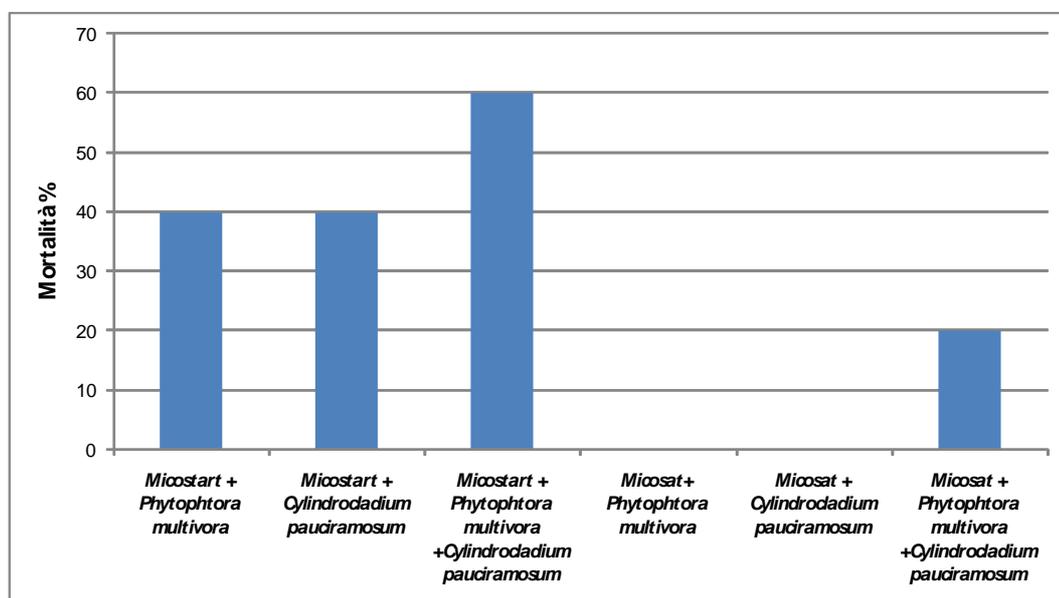
L'utilizzo di un prodotto commerciale, Micosat F VO12 WP, ha influito positivamente nel contenimento della mortalità nelle tesi *Phytophthora multivora* Micosat e *Cylindrocladium pauciramosum* Micosat, che risulta significativamente ridotta rispetto alle tesi *Phytophthora multivora* terriccio e *Cylindrocladium pauciramosum* terriccio, mentre la tesi testimone Micosat ha manifestato una mortalità elevata rispetto alla tesi testimone terriccio. La tesi *Cylindrocladium pauciramosum* Micosat ha una mortalità significativamente superiore rispetto alla tesi *Phytophthora multivora* Micosat. (Fig. 16).

Tutte le tesi con Micosat presentano un'altezza media significativamente inferiore rispetto alle corrispondenti tesi con terriccio. Entrambe le tesi *Phytophthora multivora* Micosat e *Cylindrocladium pauciramosum* Micosat risultano meno sviluppate in altezza rispetto alla tesi testimone Micosat per effetto dei patogeni. La tesi *Phytophthora multivora* Micosat risulta più sviluppata in altezza rispetto alla tesi *Cylindrocladium pauciramosum* Micosat per l'effetto inibitorio del Micosat su *Phytophthora*. (Fig. 17)

Non ci sono differenze significative nell'incremento giornaliero in altezza tra le tesi con Micosat. Si nota la differenza anche nella velocità di crescita, oltre che nell'altezza con le tesi con solo terriccio (Fig. 18)

#### 4.6. Confronto dell'efficacia di due ammendanti con attività biologica nei confronti di *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum*

Il Micosat F VO12 WP rispetto al Micostart ha determinato una riduzione della mortalità delle piantine di *Polygala myrtifolia*, che è stata nulla per le tesi in cui i patogeni *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum* sono stati inoculati singolarmente, mentre è risultata del 20% per la tesi in cui i patogeni sono stati inoculati insieme. Anche nella tesi Micostart + *Phytophthora multivora* + *Cylindrocladium pauciramosum* la mortalità è risultata più elevata rispetto alle tesi in cui i patogeni sono stati inoculati singolarmente (Fig 20, Fig. 22 a, b), confermando i risultati ottenuti nei precedenti saggi di patogenicità.



**Fig. 20.** Effetto di due diversi ammendanti (Micosat e Micostart) sulla mortalità (%) delle piantine di *Polygala myrtifolia* dopo due mesi dal trapianto in terreno infestato con *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum*, singolarmente o congiuntamente.



**Fig. 21.** (a) Effetti del Micosat miscelato al terriccio su piantine di *Polygala myrtifolia* inoculate con *Phytophthora multivora* e *Cylindrocladium pauciramosum*. Si nota una riduzione della mortalità delle piantine nella tesi trattata con questo ammendante (1, 3 e 5 fila da sinistra). (b) Per contro, si nota un'elevata mortalità delle piantine trapiantate in terriccio infestato con *Cylindrocladium pauciramosum*, anche nella tesi trattata con l'ammendante (1, 3 e 5 fila da sinistra).



**Fig. 22.** (a).Confronto tra due ammendanti (Micosat e Micostart) miscelati al terriccio sulla mortalità e lo sviluppo di piantine di *Polygala myrtifolia* trapiantate su terreno infestato con *Cylindrocladium pauciramosum* e *Phytophthora multivora*. A sinistra terriccio miscelato con Micostart, al centro terriccio miscelato con Micosat e a destra terriccio senza ammendanti. (b) Confronto dell'effetto di due ammendanti su piantine di *Polygala myrtifolia* trapiantate su terreno infestato con *P. multivora*. A sinistra terriccio senza ammendanti, al centro terriccio miscelato con Micostart e a destra terriccio miscelato con Micosat.

## 5. DISCUSSIONE

I risultati di questo studio confermano che i marciumi radicali causati da specie terricole di *Phytophthora* sono una malattia comune nei vivai di piante ornamentali sia in Sicilia che in altre regioni dell'Italia settentrionale, quali la Liguria e il Piemonte.

Nella maggior parte dei vivai sono state trovate piante infette da *Phytophthora*; sono state identificate ben 21 specie di *Phytophthora* su 99 specie diverse di piante ornamentali appartenenti a 39 famiglie. Di queste, 16 erano nuove combinazioni ospite-patogeno. In Sicilia, in particolare, dove il campionamento è stato effettuato in 18 vivai ubicati nel versante orientale dell'isola, infezioni radicali di *Phytophthora* sono state riscontrate su 29 diverse specie di piante ornamentali. Particolarmente interessante il fatto che il 28% delle piante asintomatiche sia risultato infetto da *Phytophthora*. Questo dato dimostra chiaramente quanto sia elevato il rischio che la disseminazione della malattia avvenga attraverso il commercio di piante apparentemente sane. La polifagia della maggior parte delle specie di *Phytophthora* e la presenza contemporanea nello stesso vivaio di specie diverse di *Phytophthora* e di piante-ospiti favoriscono la disseminazione dell'inoculo di questi patogeni all'interno dello stesso vivaio. Un altro rischio conseguente alla presenza contemporanea nello stesso vivaio di specie diverse di *Phytophthora* è la possibilità di comparsa di nuove varianti in seguito ad ibridazione interspecifica. Ibridi interspecifici di *Phytophthora* virulenti sono stati segnalati di recente in vivai di piante ornamentali in diversi paesi europei, compresa l'Italia. *Phytophthora x pelgrandis* è stata segnalata in Italia, quale agente di marciume radicale e del colletto di *Lavandula stoechas*

(Faedda *et al.*, 2013), in Ungheria (Szigethy *et al.*, 2013), in Germania (Nirenberg *et al.*, 2009).

La specie di *Phytophthora* più comune nei vivai di piante ornamentali siciliani visitati è risultata *P. nicotianae*, che è stata isolata da 20 specie di piante ospiti diverse ed è risultata presente in 9 vivai su un totale di 10 in cui sono state rinvenute specie di *Phytophthora*. Questo dato sulla prevalenza di *P. nicotianae* sulle altre specie dello stesso genere concorda con i risultati dei monitoraggi effettuati nei vivai di piante ornamentali di altri paesi, quali la Spagna e gli Stati Uniti d'America (Moralejo *et al.*, 2009; Olson e Benson, 2011). Probabilmente, *P. nicotianae*, che ha un optimum termico di circa 30 °C ed una temperatura massima di crescita maggiore di 35 °C, è stata favorita dalle condizioni di allevamento delle piante, che in maggioranza sono specie originarie di climi mediterranei caldo-aridi, subtropicali o tropicali. Un'altra specie termofila di *Phytophthora* rinvenuta frequentemente è stata *P. palmivora*; questa specie esotica, probabilmente originaria del sud-est dell'Asia (Erwin e Ribeiro, 1996), produce sporangi caduchi che vengono disseminati facilmente dagli impianti di irrigazione per aspersione sopra chioma. Anche *P. palmivora*, come *P. nicotianae*, è estremamente polifaga; tra le malattie causate da questa specie, da sola o in combinazione con la stessa *P. nicotianae*, è apparsa particolarmente dannosa nei vivai siciliani quella nota come marciume del germoglio centrale (*Phytophthora bud rot*) delle palme. Il marciume del germoglio centrale delle palme era stato segnalato in Sicilia già diversi anni or sono (Magnano di San Lio *et al.*, 1986) in vivaio su piantine di *Chamaedorea elegans* allevate in vaso e nel corso di questo studio è stato riscontrato anche su altre specie di palma, quali *Chamaerops humilis* e *Trachycarpus fortunei* (Faedda *et al.*, 2011; Cacciola *et al.*, 2011).

Le esigenze termiche sono il principale fattore che condizionano la frequenza con cui le diverse specie di *Phytophthora* si isolano nel corso dell'anno. Alcune specie, quali *P. cryptogea*, che ha un optimum termico più basso di quello di *P. nicotianae* e di *P. palmivora*, è stata isolata soprattutto in primavera e con minore frequenza anche nei mesi invernali. In generale, invece, la frequenza di isolamento delle specie termofile, quali *P. nicotianae* e *P. palmivora*, è risultata più elevata durante l'estate e si è notevolmente ridotta nei mesi invernali. In estate, probabilmente, l'incremento delle popolazioni di *Phytophthora* è stato favorito sia dalla temperatura che dalla crescita delle radichette.

In passato i danni causati dalle infezioni radicali di *Phytophthora* nei vivai di piante ornamentali sono stati sottovalutati, sia per le scarse conoscenze sugli agenti eziologici della malattia sia per la difficoltà di diagnosi, conseguente alla mancanza di sintomi specifici e, fino a qualche anno fa, di idonee tecniche diagnostiche. Infatti, poiché le specie di *Phytophthora* hanno una scarsa capacità competitiva come saprofiti e di conseguenza sui comuni substrati di coltura si sviluppano più lentamente di altri microrganismi terricoli, per isolarle direttamente dal terreno e dalle radici è necessario ricorrere all'impiego di substrati selettivi. Inoltre, le infezioni radicali di *Phytophthora* sono spesso associate a quelle di altri patogeni terricoli che si isolano con maggiore facilità e pertanto ne mascherano la presenza.

A tal proposito, questo studio ha consentito di chiarire il ruolo di *P. multivora* nel deperimento delle piantine di *Polygala myrtifolia*, un problema fitopatologico di rilevante interesse pratico nei vivai siciliani, sinora attribuito esclusivamente alle infezioni dell'ascomicete terricolo *Cylindrocladium pauciramosum* (Polizzi e Crous, 1999; Perez-Sierra *et al.*, 2005). Sia gli isolamenti effettuati su substrato selettivo per *Phytophthora*

sia i saggi di patogenicità hanno messo in evidenza che *P. multivora* è frequentemente associata alla mortalità delle piantine di *P. myrtifolia* in vivaio e la sua virulenza nei confronti di questa pianta ornamentale di origine australiana non si è discostata significativamente da quella di *C. pauciramosum*. *P. multivora* e *C. pauciramosum*, inoltre, inoculati congiuntamente sulle piantine di *P. myrtifolia* hanno mostrato sinergia.

La frequenza dei marciumi radicali causati da *Phytophthora* e l'entità dei danni palesi o occulti che essi causano hanno fatto sì che nei vivai di piante ornamentali il trattamento dei terricci e delle piantine con fungicidi efficaci contro gli Oomiceti, quali ad esempio il mefenoxam, il fosetil alluminio ed il propamocarb siano diventati una pratica di routine. Questi trattamenti, tuttavia, non sempre risultano efficaci. Anche nel settore delle piante ornamentali, inoltre, è in crescente aumento la domanda di prodotti esenti da residui di agrofarmaci. Per questo motivo, nel presente studio sono state effettuate prove sperimentali per valutare l'efficacia di ammendanti bioattivi nei confronti del marciume radicale di *P. myrtifolia* causato da *P. multivora* e *C. pauciramosum*.

I risultati delle prove effettuate con l'ammendante bioattivo Micosat F VO12 WP, per quanto preliminari, appaiono di un certo interesse pratico. L'incorporamento del prodotto nel terriccio ha contenuto significativamente la mortalità causata da entrambi i patogeni terricoli, sebbene sia risultato più efficace nei confronti di *P. multivora*. Tuttavia, l'aggiunta di dosi elevate di ammendante nel terriccio ha mostrato effetti fitotossici sulle piantine. Questo dato, se da un lato lascia sperare nella possibilità di utilizzare questo tipo di ammendanti per la lotta ai marciumi radicali da *Phytophthora*, dall'altro evidenzia la necessità di perfezionare ulteriormente le modalità di applicazione

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ADONIA G., MAGNANO DI SAN LIO G., PERROTTA G. 1992. Efficacia del fosfito di potassio contro la gommosi degli agrumi da *Phytophthora citrophthora* (S.M. e S.M) Leon. Atti delle Giornate Fitopatologiche (1992), 2: 93-102.
- AGRIOS G. 2005. Plant Pathology. 5th Ed., Elsevier Academic Press, Burlington, MA01803, USA.
- BADALÀ F., TAMBURINO V., CACCIOLA S.O., ZIZZO G.V., MAGNANO DI SAN LIO G. 2009. Malattie emergenti nei vivai di piante ornamentali dell'Italia meridionale. Protezione delle colture, 4:20-24.
- BRASIER C.M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. Plant Pathology, 57: 792-808.
- BRASIER C.M., HAMM P.B., HANSEN E.M. 1993. Cultural characters, protein patterns and unusual mating behaviour of *Phytophthora gonapodyides* isolates from Britain and North America. Mycological Research, 97: 1287-1298.
- BRASIER C.M., SANSOME E. 1975. Diploidy and gametangial meiosis in *Phytophthora cinnamomi*, *P. infestans* and *P. drechsleri*. Transactions of the British Mycological Society 65: 49-65.
- CACCIOLA S.O. 2009. Malattie emergenti delle piante causate da patogeni fungini in Italia. Protezione delle Colture, 2: 42-46.
- CACCIOLA S.O., PANE A., DAVINO M., MAGNANO DI SAN LIO G. 1998. First report of root rot caused by *Phytophthora cinnamomi* on avocado in Italy. Plant Disease, 82 (11): 1281.
- CACCIOLA S.O., PANE A., FAEDDA R., RIZZA C., BADALÀ F., MAGNANO DI SAN LIO G. 2011. Bud and root rot of Windmill Palm (*Trachycarpus fortunei*) caused by simultaneous infections of *P. nicotianae* and *Phytophthora palmivora* in Sicily. Plant Disease, 95 (6): 769.
- CACCIOLA S.O., PENNISI A.M., PANE A., BUFFA R., MAGNANO DI SAN LIO G.

2003. *Phytophthora palmivora*: un problema emergente nei vivai di piante ornamentali in Italia. Notiziario sulla protezione delle piante (A.I.P.P.), 17 (N. S.): 25-28.
- CACCIOLA S.O., SCIBETTA S., PANE A., FAEDDA R., RIZZA C. 2009. *Callistemon citrinus* and *Cistus salvifolius*, two new hosts of *Phytophthora* taxon *niederhauserii* in Italy. Plant Disease, 93 (10): 1075.
- CACCIOLA S.O., CHIMENTO A., PANE A., COOKE D.E.L., MAGNANO DI SAN LIO G. 2005. Root and foot rot of Lantana caused by *Phytophthora cryptogea*. Plant Disease, 89 (8): 909.
- CALVET C., CAMPRUBI A. 1996. Integración de las micorrizas arbusculares en el proceso de producción de patrones de cítrico. Levante agrícola/1<sup>er</sup> trimestre: 62-66.
- CHEN D.W., ZENTMYER G.A. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. Mycologia, 63: 397-402.
- Clark M.F., Adams A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant virus. J. Gen. Virol., 34: 475-483.
- COFFEY M.D. 1987. *Phytophthora* root rot of avocado. Plant Disease, 71 (11): 1046-1052.
- COFFEY M.D., OUIMETTE D.G. 1989. Phosphonates: antifungal compounds against oomycetes. In: Nitrogen, Phosphorus and Sulfur utilization by Fungi (ed. Boddy L., Marchant R., Read D. J.), Cambridge University Press, Cambridge: 107-129.
- COOKE D.E.L., DRENTH A., DUNCAN J.M., WAGELS G., BRASIER C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal Genetics and Biology, 30: 17-32.
- COOKE D.E.L., DRENTH A., DUNCAN J.M., WAGELS G., BRASIER C.M., 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal Genetics and Biology, 30, 17-32.
- COOKE D.E.L., SCHENA L., CACCIOLA S.O. 2007. Tools to detect, identify and

- monitor *Phytophthora* species in natural ecosystem. Journal of Plant Pathology, 89 (1): 13-28
- COOPER K. M. 1984. Physiology of VA mycorrhizal association. In: VA Mycorrhiza. C. L. Powell y D. J. Bagyaraj. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón, Fl., USA: 155-186.
- CRISTINZIO G., CAMELE I., MARCONE C. 2006. *Phytophthora tentaculata* su gerbera in Italia. Informatore Fitopatologico, 56 (2): 23-25
- DAVINO M., CACCIOLA S.O., PENNISI A.M., LI DESTRI NICOSIA M.G. 2002. *Phytophthora palmivora* a new pathogen of lavender in Italy. Plant Disease, 86 (5): 561.
- DE BOER R.F., GREENHALG F.C., PEGG K.J., MAYERS P.E., LIN T.M. E FLETT S. 1990. Phosphorous acid treatments control *Phytophthora* diseases in Australia. EPPO Bulletin, 20: 193-197
- DEWEY F.M., THORNTON C.R. 1995. Fungal immunodiagnosics in plant agriculture. In New Diagnostics in Crop Sciences, Biotechnology in Agriculture 13: 151-170. Eds J H Skerritt and R Appels. Wallingford, UK: CAB International.
- DEWEY F.M., THORNTON C.R., GILLIGAN C.A. 1997. The use of monoclonal antibodies to detect, quantify and visualise fungi in soils. Advances in Botanical Research, 24: 275-308.
- DOYLE J.J., DOYLE J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
- ERWIN D.C., RIBEIRO O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- FAEDDA R., CACCIOLA S.O, SZIGETHY A., BAKONYI J., MAN IN'T VELD W. A., MARTINI P., PANE A., SCHENA L, MAGANO DI SAN LIO G. 2013. *Phytophthora x pelgrandis* causes root and collar rot of *Lavandula stoechas* in Italy. Plant Dis., ISSN: 0191-2917 (In corso di stampa)
- FAEDDA R., PANE A., GRANATA G., MAGNANO DI SAN LIO G. 2011. First report of *Phytophthora nicotianae* as pathogen of blue Mediterranean fan

palm. NEW DIS. REP. 23:3 [HTTP://DX.DOI.ORG/10.5197/J.2044-0588.2011.023.003](http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2011.023.003).

- FRANCL L. J. 1993. Interactions of nematodes with mycorrhizae and mycorrhizal fungi. In: Nematode Interactions. M. W. Khan. Chapman and Hall (Eds.). London, UK: 203-216.
- GARIBALDI A., MAGNANO DI SAN LIO G., GULLINO M.L. 2004. Alcune considerazioni sui problemi fitopatologici emergenti delle colture ornamentali. *Informatore fitopatologico*, 7-8: 19-32.
- GERDMANN JW 1968. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6:379-418.
- Grimm G.R., Alexander A.F., 1973. "Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries, *Phytopathology*, 63: 540-547.
- GULLINO M.L., BENUZZI M. 2003. Mezzi biologici e prodotti di origine naturale per la difesa dai parassiti terricoli. *Informatore fitopatologico - La Difesa delle piante*, 53 (10): 51-57.
- HAGLE S.K.E., SHAW C.G. 1991. Avoiding and reducing losses from *Armillaria* root disease. In: *Armillaria* root disease. Agriculture Handbook n. 691, Forest Service, U.S.D.A., Washington, pp.157-173.
- HARLEY J. L., SMITH S. E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. 2<sup>nd</sup> printing. Academic Press, London, UK. Pp. 483
- HEID C.A., STEVENS J., LIVAK K.J., WILLIAMS P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994.
- HENEGARIU O., HEEREMA N.A., DLOUHY S.R., VANCE G.H., VOGT P.H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23: 504-511.
- IPPOLITO A., DE CICCIO V., SALERNO M. 1991. Aspetti eziologici ed epidemiologici del marciume radicale degli agrumi da *Phytophthora* spp. in Puglia e Basilicata. *Medit.* 30: 47-51.

- IPPOLITO A., SCHENA L., NIGRO F. 2002. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. European Journal of Plant Pathology, 108: 855-868.
- JUDELSON H.S., BLANCO F.A. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. Nature Reviews Microbiology, 3: 47-58.
- KAMOUN S. 2003. Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. Eukaryotic Cell 2: 191-199.
- KANNWISCHER, M.E., D.J. MITCHELL. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. Phytopathology, 68:1760–1765.
- KENNEDY R., WAKEHAM A.J., BYRNE K.G., MEYER U.M., DEWEY F.M. 2000. A new method to monitor airborne inoculum of the fungal plant pathogens *Mycosphaerella brassicicola* and *Botrytis cinerea*. Appl. Environ. Microbiol., 66: 2996–3003.
- LEE S. B. & TAYLOR J. W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications (ed. M. A. Innis, D.) 282-287.
- LÉVESQUE C.A. 2001. “Molecular methods for detections of plant pathogens - what is the the future? Canadian journal of plant pathology, 24: 333-336.
- LI H., CUI X. AND ARNHEIM N. 1990. Direct electrophoretic detection of the allelic state of single DNA molecules in human sperm by using the polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 87:4580±4584.
- LINDERMAN R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In: G.J. Bethlenfalony and R.G. Linderman, eds. Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. ASA Special Publ. Madison, WI, 54: 45-70.
- Magnano di San Lio G., Cacciola S.O., Perrotta G. 1986. Note critiche su isolati di *Phytophthora palmivora* rinvenuti in Italia. *Phytopathologia*

*Mediterranea*, 25, 92-100.

- MAGNANO DI SAN LIO G., PENNISI A. M. 1994. Spatial pattern of inoculum of *Phytophthora* in soil of citrus groves. Proc. Int. Soc. Citriculture, 1992 3: 1278-1282.
- MAGNANO DI SAN LIO G., PERROTTA G. 1982. Determinazione quantitativa nel terreno di specie di *Phytophthora* patogene per gli agrumi. Potenziale di malattia e densità di inoculo." *Phytopath. Medit.* 21: 59-65.
- MARTIN R.R., JAMES D., LEVESQUE C.A. 2000. Impacts of molecular technologies on plant disease management. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 38: 207-239.
- MARTINI P, PANE A., RAUDINO F., CHIMENTO A., SCIBETTA S., CACCIOLA S. O. 2009. First Report of *Phytophthora tentaculata* causing root and stem rot of oregano in Italy. *Plant Disease*, 93 (8): 843
- MARTINI P., SCIBETTA S., ALLATTA C., PANE A., CACCIOLA S.O. 2007. New reports of *Phytophthora hedraiandra*, *P. niederhauserii* and *P. tentaculata* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89 (3), S47.
- MASAGO H., YOSHIKAWA M., FUKADA M., NAKANISHI N. 1977. Selective inhibition of *Pythium spp.* on a medium for direct isolation of *Phytophthora spp.* from soil and plants. *Phytopathology*, 67: 425-428.
- MENGE J.A., 1986. Use of new systemic fungicides on citrus. *Citrograph*, 71: 245-250.
- MINUTO A., GULLINO M.L., TITONE P., GARIBALDI A. 2001. Influence of cultural practices on incidence of *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* causing root rot of lavender (*Lavandula officinalis*). *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 45-54.
- MITCHELL J.E. 1979. The dynamics of the inoculums potential of population of soil borne plant pathogens in the soil ecosystem. In : Soil borne plant pathogens (Shippers B. e Gams W. coord.) Academic Press Inc., London. Pp.3-20.
- MORALEJO, E., PÉREZ-SIERRA, A. M., ÁLVAREZ, L. A., BELBAHRI, L., LEFORT,

- F., DESCALS, E. 2009. Multiple alien *Phytophthora* taxa discovered on diseased ornamental plants in Spain. *Plant Pathology*, 58:100-110.
- MULLIS KB, FALOONA FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335–350.
- MUMFORD R., BOONHAM N., TOMLINSON J., BARKER I. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 1-19.
- MUMFORD R.A., JARVIS B., HARJU V., BOONHAM N., SKELTON A. 2006. First report of Broad bean wilt virus 2 in UK: findings in foxglove and salvia. *Plant Pathology*, 55 (6): 819-819.
- MUTASA E.S., CHWARSZCZYNSKA D., ADAMS M.J., WARD E., ASHER M. J. C. 1995. Development of PCR for the detection of *Polymyxa betae* in sugar beet roots and its application in field studies. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47: 303-313.
- NIRENBERG H. I., GERLACH W. F., GRÄFENHAN, T. 2009. *Phytophthora x pelgrandis*, a new natural hybrid pathogenic to *Pelargonium grandiflorum*. *Mycologia*, 101:220-231.
- OLSON H. A., BENSON D. M. 2011. Characterization of *Phytophthora* spp. on Floriculture Crops in North Carolina. *Plant Disease*, 95 (8): 1013-1020.
- PENNISI A.M, AGOSTEO G.E., CACCIOLA S.O., PANE A., FAEDDA R. 1998. Intensity to Metalaxyl among isolates of *Phytophthora capsici* causing root rot and crown rot of pepper in southern Italy. *Plant Disease*, 82 (11): 1283.
- PÉREZ-SIERRA A., ÁLVAREZ L.A., HENRICOT B., GARCÍA-JIMÉNEZ J., ARMENGOL J. 2005. *Cylindrocladium pauciramosum* causes root and collar rot of *Polygala myrtifolia* in Spain. *New Disease Reports*, 11: 38.
- PERRIN R. 1991. Mycorrhizes et protection phytosanitaire. Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Strullu, D. G. (Ed.). *Technique et*

Documentetion Lavoisier, Paris, Francia, 93-130.

- PETTITT T.R., WAKEHAM A.J., WAINWRIGHT M.F., WHITE J.G. 2002. Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water. *Plant Pathology*, 51: 720-727.
- PITTIS J.E., COLHOUN J. 1984. Isolation and identification of pythiaceous fungi from irrigation water and their pathogenicity to *Antirrhinum*, tomato and *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 110: 301-318.
- POLIZZI G., CROUS P.W. 1999. Root and collar rot of milkwort caused by *Cylindrocladium pauciramosum*, a new record for Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 407–411.
- RIBEIRO O.K. 1978. A Source Book of the Genus *Phytophthora*. Vaduz, Germany: J. Cramer.
- RONCADORI R. W. 1997. Interaction between arbuscular mycorrhizas and plant parasitic nematodes in agro-ecosystem. In: Multiprophic interactions in terrestrial systems: 101-113
- SANDLER H.A., TIMMER L.W., GRAHAM J.H., ZITKO S.E. 1989. Effects of fungicide applications on populations of *Phytophthora parasitica* and on feeder rot densities and fruit yields of citrus trees. *Plant disease*, 73: 902-906.
- SANGER F. NICKLEN S. COULSON A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Volume 74, Issue 12, 5463-5467
- SCHESSEK K., LUDER A., HENSON J.M. 1991. Use of polymerase chain reaction to detect the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*, in infected wheat plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 553-556.
- SMILLIE R. H., DUNSTAN R. H., GRANT B. R., GRIFFITH J. M., ISER J., HIERE J.

- O. 1990. The mode of action of the antifungal agent phosphite. EPPO Bulletin, 20: 185-192.
- SMITH G. S. 1987. Interactions of nematodes with mycorrhizal fungi. In: Vistas on Nematology. Veech, J. A. y Dickson, D. W. (Eds.). Society of Nematologist, Inc. Hyattsville, MD, USA: 292-300.
- STAMPS D. J., WATERHOUSE G. M., NEWHOOK F. J., HALL, G. S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological papers, 162: 1–28.
- SZIGETHY A., NAGY Z. Á., VETTRAINO A. M., JÓZSA A, CACCIOLA S.O. FAEDDA R., BAKONYI J. 2013. First Report of *Phytophthora x pelgrandis* Causing Root Rot and Lower Stem Necrosis of Common Box, Lavender and Port-Orford-Cedar in Hungary.. Plant Disease. 97: 152, ISSN: 0191-2917, doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0662-PDN>
- SZIGETHY A., NAGY Z. Á., VETTRAINO A. M., JÓZSA A, CACCIOLA S.O. FAEDDA R., BAKONYI J. 2012. First report of *Phytophthora x pelgrandis* causing root rot and lower stem necrosis of common box, lavender and Port-Orford-cedar Hungary. Plant Dis., <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0662-PDN>.
- THEMANN K., WERRES S. 1996. In vitro comparison of different diagnostic methods for detection of *Phytophthora* species in water. In: Proceedings of the 9th International Congress on Soilless Culture, 1996. Wageningen, the Netherlands: International Society for Soilless Culture, 535-550.
- TIMMER L.W., GRAHAM J.H., SANDLER H.A., ZITKO S.E. 1988. Population of *Phytophthora parasitica* in beating citrus orchards in Florida and response to fungicide applications. The Citrus Industry, 69:40-44 e 54.
- TIMMER L.W., GRAHAM J.H., SANDLER H.A., ZITKO S.E. 1988. Sampling citrus orchads in Florida to estimate populations of *Phytophthora parasitica*. Phytopathology, 78:940-944.

- TIMMER L.W., ZITKO S.E., SANDLER H.A., GRAHAM J.K. 1989. Seasonal and spatial analysis of population of *Phytophthora parasitica* in *Citrus* orchards in Florida to estimate populations of *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology*, 78: 940-944.
- TORRANCE L. 1995. Use of monoclonal antibodies in plant pathology. *European Journal of Plant Pathology*, 101: 351-363.
- TSAO P.H. 1960. A serial dilution end-point method for estimating disease potentials of citrus *Phytophthora* in soil. *Phytopathology*, 50: 717-724.
- TUCKER, C. M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora*. *Univ. Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.*, 153.
- WARD E., FOSTER S.J., FRAAIJE B.A., MCCARTNEY H.A. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Ann. Appl. Biol.*, 145: 116.
- WATERHOUSE G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Common. Mycol. Inst., Mycological Papers*, 92: 22.
- WERRES S, STEFFENS C. 1994. Immunological techniques used with fungal plant pathogens - aspects of antigens, antibodies and assays for diagnosis. *Annals of Applied Biology*, 125:615-643.
- YAP E.P.H., LO Y.-M., FLEMING O., MCGEE K.A. 1994. False-positives and contamination in PCR. In: Griffi H.G. and Griffin A.M. (Eds.), *PCR Technology: Current Innovations*. CRC Press, Boca Raton, 249-258.